



Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wydział Biologii i Biotechnologii

ROZPRAWA DOKTORSKA

Magdalena Anna Podbielska

WPŁYW KOMERCYJNEGO PREPARATU BIOLOGICZNEGO NA DEGRADACJĘ WYBRANYCH FUNGICYDÓW

Influence of a commercial biological preparation on degradation of selected fungicides

Promotor

dr hab. Ewa Szpyrka

prof. Uniwersytetu Rzeszowskiego

Promotor pomocniczy

dr Małgorzata Kus-Liśkiewicz

Uniwersytet Rzeszowski

Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii i Biotechnologii



Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Biotechnologii
Instytutu Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego

Składam serdeczne podziękowania
Pani Promotor dr hab. Ewie Szpyrka, prof. UR
oraz Pani Promotor pomocniczej
dr Małgorzacie Kus – Liśkiewicz
za opiekę merytoryczną,
pomoc oraz nieustającą życzliwość
podczas realizacji niniejszej pracy.

Dziękuję również moim Rodzicom,
Mężowi i Córeczce.

1. WSTĘP	6
Właściwości odżywcze, lecznicze oraz zastosowanie jabłek	7
Choroby jabłoni i ochrona sadów jabłoniowych	9
Podział, rola i znaczenie pestycydów	15
Charakterystyka wybranych substancji czynnych fungicydów.....	17
Pozostałości środków ochrony roślin w jabłkach	24
Degradacja pestycydów w środowisku	26
Biologiczna ochrona roślin, w tym jabłoni	28
2. CEL I ZAKRES PRACY.....	33
3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	35
3.1 Badania laboratoryjne	35
3.1.1 Ocena stężenia inhibującego/bójczego dla bakterii <i>B. subtilis</i>	37
3.1.2 Degradacja pestycydów przez bakterie <i>B. subtilis</i>	38
3.1.3 Ocena żywotności komórek <i>B. subtilis</i>	38
3.1.4 Ocena stężenia inhibującego/bójczego wobec grzyba referencyjnego <i>S. cerevisiae</i>	39
3.1.5 Degradacja pestycydów przez grzyba <i>T. harzianum</i>	39
3.1.6 Degradacja pestycydów przez mieszaną kulturę bakterii <i>B. subtilis</i> i grzyba <i>T. harzianum</i>	39
3.2 Badania polowe	40
3.2.1 Obiekty doświadczalne	40
3.2.2 Aplikacja preparatów chemicznych i biologicznych	41
3.2.3 Pobieranie próbek	43
3.2.4 Warunki pogodowe	43
3.3 Oznaczanie pozostałości substancji czynnych	47
3.3.1 Wzorce substancji czynnych	47
3.3.2 Wyposażenie pomiarowe	47
3.3.3 Oznaczanie substancji czynnych w podłożach hodowlanych techniką GC – MS/MS – optymalizacja metody	47
3.3.4 Oznaczanie substancji czynnych w jabłkach	50
3.3.4.1 Ekstrakcja analitów metodą LSE i oznaczanie techniką GC – μ ECD/NPD	50
3.3.4.2 Ekstrakcja analitów metodą Quechers i oznaczanie techniką GC – MS/MS	52
3.3.5 Analiza jakościowa i ilościowa	54
3.3.6 Walidacja metody	54
3.4 Wyznaczanie kinetyki zanikania substancji czynnych	56

3.5	Oznaczanie mikotoksyn w próbkach jabłek.....	56
3.5.1	Patulina	57
3.5.2	Trichoteceny i zearalenon	58
3.6	Analiza statystyczna	59
4.	WYNIKI BADAŃ	60
4.1	Oznaczanie pozostałości substancji czynnych	60
4.1.1	Oznaczanie substancji czynnych w podłożach hodowlanych – optymalizacja i walidacja metody	60
4.1.2	Oznaczanie substancji czynnych w jabłkach – walidacja metody	64
4.2	Doświadczenia laboratoryjne	66
4.2.1	Badania żywotności/aktywności metabolicznej komórek	66
4.2.2	Testy inhibicji wzrostu wobec bakterii <i>B. subtilis</i> i grzyba referencyjnego <i>S. cerevisiae</i>	67
4.2.3	Badanie degradacji substancji czynnych pestycydów przez bakterie <i>B. subtilis</i> ...	71
4.2.4	Badanie degradacji substancji czynnych pestycydów przez grzyba <i>T. harzianum</i>	76
4.2.5	Badanie degradacji substancji czynnych pestycydów przez mieszaną kulturę bakterii <i>B. subtilis</i> i grzyba <i>T. harzianum</i>	80
4.3	Doświadczenia polowe	84
4.3.1	Doświadczenie 1.....	84
4.3.2	Doświadczenie 2.....	88
4.3.3	Doświadczenie 3.....	90
4.3.4	Doświadczenie 4.....	93
4.3.5	Doświadczenie 5.....	97
4.3.6	Doświadczenie 6.....	100
4.4	Zawartość mikotoksyn w próbkach jabłek.....	102
5.	DYSKUSJA.....	103
	Fluopyram i tebukonazol.....	105
	Boskalid i pyraklostrobina	109
	Pentiopirad	112
6.	WNIOSKI	114
7.	PODSUMOWANIE.....	115
8.	SUMMARY	116
9.	WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	117
10.	LITERATURA.....	119

1. WSTĘP

Głównym celem rolnictwa jest produkcja bezpiecznej i wysokiej jakości żywności dla stale rosnącej populacji ludzi na całym świecie. Wraz z rozwojem technik służących zwiększaniu efektywności produkcji, równocześnie rosną problemy związane ze stosowaniem syntetycznych związków chemicznych w rolnictwie. Przede wszystkim należy mieć tu na uwadze toksyczny wpływ na zdrowie człowieka i środowisko oraz rozwój oporności na patogeny roślin i szkodniki. Z tego powodu obecnie rośnie zainteresowanie wykorzystaniem biologicznych metod w tym m.in. mikroorganizmów, celem poprawy zdrowia i produktywności roślin, przy jednoczesnym zapewnieniu bezpieczeństwa ludzi i środowiska.

Preparaty mikrobiologiczne stosowane są między innymi do ochrony roślin, stymulowania ich wzrostu i plonowania, a także wykorzystywane są w procesach bioremediacji do eliminowania problemów związanych ze stosowaniem chemicznych nawozów i pestycydów (Higa i Parr 1994).

Pestycydy stanowią liczną i zróżnicowaną grupę związków chemicznych stosowanych do zwalczania organizmów patogennych, służą ochronie roślin, zwierząt czy zbiorników wodnych. Największe zastosowanie pestycydów odnotowuje się w rolnictwie do chemicznej ochrony roślin, co w konsekwencji może prowadzić do występowania pozostałości tych substancji w produktach żywnościowych. Obecnie, najczęściej używa się insektycydów, herbicydów oraz fungicydów, często stosowanych tuż przed zbiorem owoców czy warzyw (Aktar i in. 2009).

Pestycydy są związkami silnie toksycznymi, a pobieranie ich regularnie z żywnością i/lub w wysokich stężeniach może mieć poważne następstwa dla zdrowia. Kumulacja pestycydów w organizmie człowieka może wywoływać nowotwory, problemy z rozwojem płodu i dzieci oraz zaburzenia układów biologicznych (rozrodczego, odpornościowego, hormonalnego, nerwowego) (Chance 2000, Petit i in. 2010).

Pestycydy są stosowane do ochrony upraw sadowniczych w tym sadów jabłoniowych. Polska jest jednym z największych producentów jabłek w Europie i na świecie (Kraciński 2016). Pozostałości pestycydów, w tym fungicydów, najczęściej stwierdza się w jabłkach, które spożywa się głównie w postaci nieprzetworzonej, bezpośrednio po zbiorze (Łozowicka i in. 2011). Stanowi to bezpośrednią przyczynę narażenia zdrowia konsumenta po ekspozycji na pestycydy. W ostatnich latach, świadomość zdrowotna konsumentów znacząco wzrasta. Zwraca się coraz większą uwagę na stosowane w produkcji żywności substancje chemiczne. W związku z powyższym, obserwowana jest tendencja w świecie, wywierana zarówno presją konsumenta, ale również postulowana przez komitety czy organizacje prawne UE, do znaczącego obniżenia

dozwolonych dawek pozostałości pestycydów w żywności (Czaja i in. 2015). Ich ilość zależy w dużej mierze od liczby zabiegów, dawki, postaci preparatu, właściwości fizykochemicznych substancji czynnej, czynników środowiskowych (temperatury, światła, wilgoci w powietrzu), a także rodzaju uprawy. Ponadto, ważny jest czas, jaki upłynął od zabiegu z użyciem pestycydu, do zbioru plonu, gdyż w tym okresie następuje obniżanie się stężenia pestycydów – degradacja (Bizuik 2001). Rozkład pestycydów zachodzi głównie na drodze przemian biochemicznych. Może być również warunkowany zachodzącymi reakcjami fotochemicznymi, czyli rozkładem pod wpływem światła słonecznego, czy na drodze chemicznej w wyniku reakcji takich jak: utlenianie, redukcja czy hydroliza (Różański 1992).

Obecnie, w biotechnologii środowiska poszukuje się nowych, alternatywnych metod rozkładu środków ochrony roślin. Znane są preparaty zawierające florę mikroorganizmów, używane jako nawozy mineralne i/lub preparaty do ochrony roślin. Takie preparaty zaleca się stosować naprzemiennie z preparatami chemicznymi w celu poprawy jakości i bezpieczeństwa produkowanej żywności (Ustawa 2013).

Z przeglądu literatury na temat degradacji pozostałości pestycydów z wykorzystaniem mikroorganizmów wynika, że najwięcej publikacji dotyczy badania rozkładu pestycydów w glebie (Cycoń i in. 2017, Kaur i Balomajumder, 2019). Działanie takie, rozumiane jako „zielona technologia” (ang. *green technology*) polega na celowym wprowadzaniu do środowiska wybranych mikroorganizmów, które wspomagają w naturalny sposób degradację pestycydów. Przegląd literatury wskazuje, że niewiele jest danych dotyczących wpływu bakterii czy grzybów na rozkład substancji czynnych pestycydów w uprawach. Dlatego też w niniejszej pracy podjęto badania nad wpływem stosowania komercyjnego preparatu biologicznego Zumba Plant® na pozostałości substancji czynnych fungicydów stosowanych w ochronie jabłoni.

Właściwości odżywcze, lecznicze oraz zastosowanie jabłek

Wysokie spożycie owoców i warzyw jest jednym z fundamentów zdrowej diety zalecanym społeczeństwu (Aune i in. 2017). Ze względu na właściwości odżywcze, konsumpcja owoców i warzyw wywiera korzystny wpływ na organizm człowieka (Folchetti i in. 2014, Safabakhsh i in. 2018, Yao i in. 2014). Liczne badania wskazują, że spożywanie 3-5 porcji owoców i warzyw dziennie chroni przed tzw. chorobami niezakaźnymi (NCD, ang. *Non-Communicable Diseases*), takimi jak choroby serca, udar mózgu i cukrzyca (Chang i in. 2016, He i in. 2007, Lichtenstein i in. 2006, Slavin i Lloyd 2012).

Jabłka są jednymi z najpopularniejszych i najczęściej spożywanych owoców na świecie, ze względu na ich dostępność przez cały rok, w postaci świeżych owoców, soków, koncentratów i dżemów (Koutsos i in. 2015). Są preferowane ze względu na ich smak i właściwości odżywcze. Składają się głównie z wody (85%) i węglowodanów (14%) głównie fruktozy. Zawierają witaminy, w szczególności C i E oraz: B2, B3, B6, B9, B12, A, D i K, minerały, głównie potas, który reguluje gospodarkę wodną, ale także: magnez, wapń, krzem, fosfor, żelazo i karotenoidy w tym likopen. Zawierają także ok. 2,21 g błonnika w 100 g owoców, z czego 70% stanowi nierozpuszczalna frakcja błonnika, w tym celuloza i hemiceluloza, natomiast 30% stanowi rozpuszczalna frakcja błonnika zawierająca głównie pektyny, z których dwie trzecie występuje w skórce (Bondonno i in. 2017).

Pektyny są złożonymi polisacharydami obecnymi w ścianie komórkowej, które nie są metabolizowane w górnym przewodzie pokarmowym u ludzi (Gulfi i in. 2006), dlatego jabłka przyspieszają trawienie oraz dają uczucie sytości. Pektyny zawarte w jabłkach obniżają stężenie cholesterolu, regulują poziom cukru we krwi oraz zwiększają powstawanie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (Bondonno i in. 2017).

Jabłka zawierają również substancje fitochemiczne odgrywające ważną rolę w przemianach biochemicznych zachodzących w organizmie człowieka. Składniki fitochemiczne m. in. kwercetyna, katechina i kwas chlorogenowy występujące w jabłkach, wykazują aktywność przeciwutleniającą, przez co hamują proliferację komórek rakowych (Boyer i Liu 2004). Jednocześnie są ważnym czynnikiem wpływającym na zapobieganie nowotworów m. in. rakowi piersi (Liu i in. 2005). Międzynarodowa agencja badań nad rakiem (IARC, ang. *International Agency for Research on Cancer*) stwierdziła, że owoce te zmniejszają ryzyko raka przełyku, żołądka i płuc oraz jamy ustnej, gardła, jelita grubego, krtani, nerek i pęcherza moczowego (IARC Handbooks of Cancer 2003). Badania naukowców wskazują na związek między częstym spożywaniem jabłek a zmniejszonym ryzykiem zachorowalności na choroby przewlekłe, takie jak choroba sercowo-naczyniowa (Koutsos i in. 2015, Tenore i in. 2019). Działanie kardioprotekcyjne jabłek przypisuje się głównie wysokiej zawartości polifenoli (Bondonno i in. 2017). Obecność polifenoli skutecznie obniża poziom cholesterolu całkowitego u ludzi, wpływa na metabolizm, zawartość lipidów i ciśnienie krwi. Testowane w badaniach klinicznych doustne spożywanie wyciągu polifenolowego z jabłoni odmiany Annurca (*Malus pumila* Miller) wywierało działanie obniżające poziom cholesterolu podobne do statyn, atorwastatyny i symwastatyny (Sommella i in. 2019). Ze względu na naturalne pochodzenie i nietoksyczność polifenoli zawartych w jabłkach znajdują się one w centrum badań wielu ośrodków badawczych, które zamierzają stosować je jako suplementy diety, leki, przeciwutleniacze i środki przeciwdrobnoustrojowe (Fujiwara i in. 2013).

Największą i najczęściej badaną podklasą polifenoli są flawonoidy w tym występujące w jabłkach flawonole (kwercetyna) i flawanole (katechina, epikatechina, epigalokatechina, proantocyjanidyny). Flawonoidy i inne fenole roślinne mają wiele biologicznych właściwości, w tym aktywność przeciwutleniającą, działanie przeciwzapalne, powodują hamowanie agregacji płytek, działają przeciwdrobnoustrojowo, przeciwnowotworowo i przeciwmutagennie (Awad i in. 2000). Badania wskazują na szereg korzystnych efektów wynikających ze spożycia flawonoidów, występujących w jabłkach. Uważa się, że mają one znaczący wpływ zarówno na zdrowie naczyń krwionośnych, jak i naczyń mózgowych, co ostatecznie może potencjalnie zapobiegać chorobom sercowo-naczyniowym i chorobom neurodegeneracyjnym (otępieniem naczyniowym) (Rees i in. 2018).

Warto również wspomnieć, że oprócz korzystnego wpływu na zdrowie człowieka, składniki te wpływają dobroczynnie na rośliny. W czasie infekcji wytwarzane flawonoidy biorą udział w reakcji obronnej przed patogenem. Zawartość flawonoidów w jabłkach w dużej mierze zależy od odmiany owoców, praktyk rolniczych, pogody, warunków przechowywania i przetwarzania.

Substancje fitochemiczne zawarte w jabłkach, mają istotny potencjał do modulowania wielu procesów w rozwoju chorób, w tym raka, chorób układu krążenia, cukrzycy, zaburzeń płucnych i choroby Alzheimera (Hyson 2011).

Konsumpcja jabłek wpływa także na obniżenie masy ciała, ułatwia wchłanianie wapnia, który zapewnia nie tylko dobry stan kości i zębów, ale również włosów i paznokci.

Żywność zawierająca składniki aktywne biologicznie, poza podstawowym dostarczaniem do organizmu substancji odżywczych, może zapewnić korzyści zdrowotne i odgrywać istotną rolę w profilaktyce chorób przewlekłych, jednak by mogła takie funkcje pełnić, nie może zawierać substancji toksycznych wpływających negatywnie na zdrowie człowieka.

Choroby jabłoni i ochrona sadów jabłoniowych

Polska jest największym producentem jabłek w Unii Europejskiej, czwartym po Chinach i Stanach Zjednoczonych i Turcji producentem na świecie. Sady jabłoniowe zajmują powierzchnię 177,2 tys. ha (stanowiąc ok. 72% wszystkich upraw sadowniczych w Polsce). Najwięcej sadów zlokalizowanych jest w województwie mazowieckim i lubelskim. W ostatnich latach dynamicznie rosła produkcja jabłek, w wyniku czego w 2016 roku odnotowano rekordowe zbiory, które wyniosły ponad 3,6 miliona ton i były ok. 15% wyższe niż zbiory w 2015 roku (Rocznik Statystyczny Rolnictwa 2017).

Dużym zagrożeniem dla sadów jabłoniowych oprócz insektów są przede wszystkim choroby powodowane przez grzyby, wirusy i bakterie (Grabowski 1999). Rośliny są podatne na choroby w przypadku wystąpienia niskich lub wysokich temperatur, niedoboru lub nadmiaru wilgoci w glebie i powietrzu, uszkodzeń mechanicznych lub uszkodzeń spowodowanych przez patogeny. Choroby pochodzenia grzybowego wywierają znaczący wpływ ekonomiczny nie tylko na plon, ale i na jakość owoców, zatem zwalczanie chorób jest zasadniczym elementem produkcji jabłek. Głównymi powodami stosowania fungicydów jest kontrolowanie i redukcja chorób występujących podczas zakładania i rozwoju uprawy, zwiększenie produktywności upraw, poprawa jakości zebranych owoców oraz wydłużenie okresu przechowywania. Często największe straty spowodowane przez choroby występują po zbiorach w okresie przechowywania owoców. Grzyby nie tylko powodują psucie przechowywanych jabłek, ale mogą także produkować toksyny (mikotoksyny), szczególnie niebezpieczne dla zdrowia człowieka (Piechowicz i in. 2016).

Najważniejszymi chorobami występującymi w sadach jabłoniowych są choroby pochodzenia grzybowego, a wśród nich:

- Parch jabłoni powodowany jest przez grzyb *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, jest najbardziej wyniszczającą chorobą sadów jabłoniowych (Khajuria i in. 2018). Występuje we wszystkich regionach uprawy jabłek na świecie, także na dziko rosnących gatunkach rodzaju *Malus* (Bowen i in. 2011, MacHardy 1996). W Polsce choroba występuje corocznie, a jej nasilenie zależy od podatności odmiany, przebiegu warunków pogodowych oraz wielkości pierwotnego źródła infekcji. Największy rozwój zarodników obserwowany jest w okresie ok. 2 tygodni po kwitnieniu (Broniarek–Niemięć 2016). Atakuje głównie liście, kwiaty i owoce. Infekcji ulegają także szypułki owocowe, ogonki liściowe, działki kielicha, a niejednokrotnie młode niezdrewniałe pędy (Muchembled i in. 2018). Górną stronę liści pokrywa aksamitny nalot oraz tworzą się ciemno – oliwkowe plamy (Rys. 1). Porażone zawiązki ulegają deformacji, a silnie porażone opadają. Straty ekonomiczne powodowane przez parcha jabłoni są bardzo wysokie. Zainfekowane owoce, z ciemnymi, okrągłymi plamami tracą wartość rynkową, a w przypadku silnego porażenia może dochodzić do znacznej redukcji lub utraty plonu. Szacuje się, że nie tylko w Polsce, ale i na świecie straty plonów, wynoszą średnio ok. 20-30%, a w latach z dużą ilością opadów w okresie wiosennym mogą przekraczać nawet 50-70% (Jha i in. 2009, Masny i Jankowski 2012, Mészka 2012). Mimo dobrze znanej epidemiologii, stosowania nowoczesnych systemów prognozujących oraz szerokiego asortymentu fungicydów do ochrony jabłoni przed parchem, zwalczanie choroby nie zawsze jest wystarczająco skuteczne, zwłaszcza na podatnych odmianach. Zapobieganie parchowi jabłoni jest oparte głównie na interwencyjnych zabiegach preparatami fungicydowymi, których każdego roku

wykorzystuje się dużą ich ilość w przeliczeniu na hektar, co wiąże się z ryzykiem zanieczyszczenia środowiska i zagrożeniem dla zdrowia człowieka (Alaniz i in. 2014).



Rysunek 1. Parch jabłoni (źródło: www.poradnikogrodniczy.pl)

- Mączniak jabłoni wywołany przez zakażenie grzybem *Podosphaera leucotricha* (Ellis & Everhart) E. S. Salmon. Jest drugim obok parcha jabłoni, powszechnie występującym patogenem (Sestras i in. 2011). Rozwój, wystąpienie i natężenie choroby uwarunkowane jest czynnikami pogodowymi. Choroba ta nasila się wraz ze wzrostem temperatury, promieniowania słonecznego i wilgoci. Mączniak jabłoni zakaża pąki, liście, kwiaty i owoce jabłoni. Pąki z silnym porażeniem zamierają i nie rozwijają się. Z pąków słabiej porażonych rozwijają się liście zainfekowane grzybem widocznym w postaci białego, mączystego nalotu (Rys. 2a). Są one drobniejsze, mają wydłużone ogonki, a blaszka liściowa zwija się, marszczy i może zamierać. Białą nalot mączniaka może występować również w wierzchołkowej części pędów jabłoni, co powoduje zahamowanie ich wzrostu, zasychanie lub deformację. Po zakażeniu kwiatów następuje również ich deformacja. Pręciki i słupki stają się sterylne, co w konsekwencji prowadzi do ich zamierania i niezawiązywania owoców. Porażenie owoców objawia się głównie w postaci ordzawień skórki i występuje od stadium zawiązków po dojrzały owoc (Rys. 2b). W przypadku słabego porażenia owoców, na skórcie pojawiają się rdzawe nitki tworzące siatkę. Natomiast w przypadku dużego porażenia tworzą się rdzawe plamy (Grabowski 1999). Zwalczanie choroby polega głównie na przycinaniu porażonych gałązek w okresie spoczynku, co zmniejsza pierwotne inokulum.



Rysunek 2. Mączniak jabłoni (a) liście, (b) owoce (źródła: (a) www.doradztwosadownicze.pl, (b) www.agrecol.pl)

Bardzo dużym problemem sadowników jest ochrona owoców przed chorobami podczas przechowywania, gdyż w największym stopniu pogarszają one jakość owoców i ich wartość handlową. Do najczęściej występujących chorób przechowalniczych należą:

- Szara pleśń – sprawcą tej choroby jest grzyb *Botrytis cinerea* Pers. (Zhao 2010). Zazwyczaj objawia się tak zwaną mokrą zgnilizną przykielichową (Rys. 3). Największe straty obserwuje się podczas przechowywania owoców (Nunes 2012, Sansone i in. 2018), ale do infekcji tej choroby dochodzi głównie podczas opadania płatków kwiatowych (tzw. utajone infekcje kwiatowych części owoców) oraz w czasie kwitnienia drzew. Szczególnie duże zagrożenie tą chorobą obserwuje się w warunkach wysokiej wilgotności powietrza.



Rysunek 3. Szara pleśń (źródło: www.ogrodoinfo.pl)

- Zgnilizny w tym gorzka zgnilizna owoców jabłoni, spowodowana przez grzyby *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz. & Sacc.) i inne wywołane przez różne gatunki grzybów (*Monilia fructigena* (Pers.) Pers. 1801, *Gloeosporium* spp., *Penicillium expansum* (Link)).
 - Gorzka zgnilizna powodowana przez grzyby *C. gloeosporioides* Powoduje ona największe straty w produkcji zarówno w Polsce jak i w Europie (Bryk 2010, Neri i in. 2009). Wzrost infekcji powodowanych przez *C. gloeosporioides* można wyjaśnić różnymi aspektami, takimi jak stosowanie bardziej specyficznych fungicydów przed zbiorem, różnice w odporności na fungicydy, lub wpływ zmian klimatycznych (Grammen i in. 2019). Choroba ta atakuje w drugiej połowie lata (lipiec, sierpień). Zarodniki grzybów tworzą się głównie na pędach i wraz z kropami deszczu przedostają się na owoce. Grzyb jest jednym z niewielu, który może przenikać przez nieuszkodzoną skórę owocu, a zakażenie zachodzi przez przetchlinki. Po zakażeniu jabłek, choroba nie rozwija się, gdyż zarodniki grzybów wchodzą w anafazę. Ujawnia się dopiero w czasie dojrzewania jabłek w przechowywaniu. Na owocach wokół przetchlinek pojawiają się plamki gnilne (tzw. oczkowanie jabłek) (Rys. 4). Ukryta forma gorzkiej zgnilizny powoduje trudności w ocenie stanu zdrowotnego owoców. Należy podkreślić, że ze względów ekonomicznych obecnie nawet 80% produkowanych owoców przed ich wprowadzeniem do obrotu lub dostarczeniem do przedsiębiorstw zajmujących się przetwarzaniem zostaje po zbiorach złożone do przechowania (Sadło i in. 2016a). Dlatego ochrona jabłek przed tą chorobą jest bardzo ważna. Polega na kilkukrotnym wykonywaniu zabiegów preparatami fungicydowymi w okresie przedzbiorczym. Może to jednak stwarzać ryzyko wystąpienia pozostałości substancji czynnych fungicydów w jabłkach, dlatego poszukuje się innych, alternatywnych do chemicznej, metod ochrony jabłek przed gorzką zgnilizną. Przykładem jest stosowanie preparatów biologicznych zawierających mikroorganizmy oraz stosowanie związków bioaktywnych pochodzenia naturalnego (np. wyciągi roślinne).



Rysunek 4. Gorzka zgnilizna (źródło: www.sadnowoczesny.pl)

- Brunatna zgnilizna wywołwana przez grzyby *Monilia fructigena* 1801 (Poniatowska i in. 2013). Głównym objawem jest gnicie owoców na drzewach oraz pojawianie się na owocach gnilnych plam w postaci zbieżnie ułożonych niewielkich, jasnobieżowych zarodników (Rys. 5). Grzyby te zimują na starych pędach i w owocach pozostałych na drzewie z poprzedniego sezonu.



Rysunek 5. Brunatna zgnilizna (źródło: www.poradnikogrodniczy.pl)

W celu zminimalizowania strat powodowanych przez choroby konieczne jest wykonanie zabiegów preparatami fungicydowymi z grup: inhibitorów demetylacji (DMI, ang. *Demethylation Inhibitors*), inhibitorów dehydrogenazy bursztynianowej (SDHI, ang. *Succinate Dehydrogenase Inhibitors*) i zewnętrznych inhibitorów chinonu (QoI, ang. *Quinone Outside Inhibitors*) (Koch i in. 2015).

W Polsce do ochrony jabłoni zarejestrowanych jest 347 środków ochrony roślin, w tym: 178 fungicydów, 65 insektycydów i 62 herbicydy, a także 14 środków zawierających bakterie i naturalne organizmy (Wyszukiwarka środków ochrony roślin).

Podział, rola i znaczenie pestycydów

Pestycydy są liczną i zróżnicowaną grupą związków chemicznych. Nazwa pochodzi od łacińskich słów *pestis* – zaraza i pomór; *caedo* – zabijam. Są to substancje syntetyczne lub naturalne wprowadzone do użycia w celu zwalczania organizmów szkodliwych lub niepożądanych dla człowieka. Nazwa „pestycydy” jest szersza niż „środki ochrony roślin”, stosuje się je do zwalczania organizmów szkodliwych m.in. w zbiornikach wodnych, do konserwacji drewna, w weterynarii do odkażania pomieszczeń i narzędzi oraz do zwalczania żywych organizmów powszechnie uznawanych za szkodliwe w budynkach: inwentarskich, mieszkalnych, szpitalnych i magazynach (Sieńczuk 2012). Pestycydy stosowane są również w zakładach włókienniczych i pralniach chemicznych do ochrony tkanin, w basenach pływackich w celu zapobiegania rozwojowi alg, w produkcji papieru i farb, jako środki grzybobójcze. Środki ochrony roślin są to preparaty zawierające jedną lub więcej substancji czynnych, w tym substancje organiczne, nieorganiczne oraz organizmy żywe. Służą do ochrony roślin uprawnych przed organizmami szkodliwymi, w tym mikroorganizmami powodującymi psucie żywności, do niszczenia chwastów i regulowania ulistnienia (Rozporządzenie WE 1107/2009).

Klasyfikacja pestycydów nie jest prosta, gdyż można podzielić je według różnych kryteriów, m.in.: ze względu na różnorodne zastosowanie, budowę chemiczną, sposób działania i przenikania do organizmów zwalczanych, trwałość w środowisku, a także stopień toksyczności.

Ogólna klasyfikacja pestycydów według ich zastosowania (Biziuk 2001, Grotowska i in. 2018, Malinowska i in. 2015, Zacharia 2011):

- algicydy – glonobójcze;
- fungicydy – grzybobójcze;
- herbicydy – chwastobójcze;
- regulatory wzrostu roślin – stymulujące lub hamujące procesy życiowe roślin (PGR, ang. *Plant Growth Regulator*);
 - defloranty – do usuwania nadmiernej ilości kwiatów;
 - defolianty – do odlistniania roślin;
 - desykanty – do wysuszania roślin;
- zoocydy – do zwalczania szkodników zwierzęcych;
 - akarycydy – roztoczobójcze;
 - atraktanty – zwabiające szkodniki;
 - bakteriocydy – bakteriobójcze
 - insektycydy – owadobójcze;

- aficydy – mszycobójcze;
- larwicydy – larwobójcze;
- owicydy – zwalczające jaja owadów i roztoczy;
- limacydy – do zwalczania ślimaków nagich;
- moluskocydy – mięczakobójcze;
- nematocydy – nicieniobójcze;
- repelenty – odstraszaające szkodniki;
- rodentocydy – gryzoniobójcze;
- synergetyki – potęgujące działanie innej substancji;
- wirowicydy – wirusobójcze.

W podziale pestycydów uwzględniając budowę chemiczną substancji czynnej wyróżniamy dwie grupy:

- organiczne (np. insektycydy fosforoorganiczne i chloroorganiczne, karbaminiany, ditiokarbaminiany, pochodne triazyny, nitrofenoli, mocznika, uracylu);
- nieorganiczne (preparaty miedziowe, preparaty zawierające siarkę).

Inny podział uwzględnia mechanizm działania w roślinie. Wyróżnia się tu związki o działaniu:

- węglowym i systemicznym (układowym);
- powierzchniowym (kontaktowym).

Uwzględniając klasyfikację według trwałości pestycydów można wyróżnić pestycydy:

- szybko zanikające (do 3 miesięcy);
- nietrwałe (do 6 miesięcy);
- trwałe (do 18 miesięcy);
- bardzo trwałe (powyżej 18 miesięcy).

Podział pestycydów ze względu na stopień toksyczności wyrażany jest za pomocą dawki śmiertelnej LD_{50} (ang. *Lethal Dose*), czyli dawki powodującej śmierć 50% zwierząt doświadczalnych wyrażanej w miligramach substancji toksycznej na kilogram masy ciała [mg/kg] (Tab. 1).

Tabela 1. Toksyczność pestycydów według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO 2009)

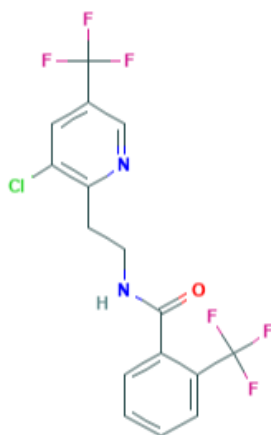
Klasa	Stopień toksyczności	LD ₅₀ dla szczura [mg/kg masy ciała]	
		doustne	skórne
Ia	wyjątkowo toksyczne	< 5	< 50
Ib	bardzo toksyczne	5 < LD ₅₀ < 50	50 < LD ₅₀ < 200
II	umiarkowanie toksyczne	50 < LD ₅₀ < 2000	200 < LD ₅₀ < 2000
III	słabo toksyczne	> 2000	> 2000
U	nie stwarza zagrożenia	≥ 5000	

Charakterystyka wybranych substancji czynnych fungicydów

SDHI, DMI i QoI są trzema najbardziej istotnymi grupami fungicydów do zwalczania chorób w rolnictwie.

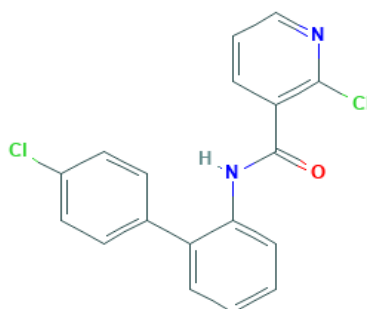
SDHI to grupa fungicydów wysoce skutecznych przeciwko chorobom atakującym zboża, owoce i warzywa. Pierwsze fungicydy zawierające karboksynę zostały wprowadzone w latach 60 XX wieku. Substancja ta stosowana była głównie do zaprawiania nasion w zwalczaniu patogenów podstawczaków. Odkrycie nowych struktur i mechanizmów otworzyło drogę dla tej grupy fungicydów, poprzez poszerzenie biologicznego spektrum działania i zwiększenie znaczenia tych fungicydów do skutecznego zastosowania przeciwko chorobom grzybowym w uprawach owoców i warzyw. Druga generacja fungicydów SDHI została wprowadzona na rynek ochrony upraw w 2003 r. Pierwszym karboksamidem o szerokim spektrum działania był boskalid. Obecnie ta grupa fungicydów jest podzielona na siedem różnych klas chemicznych. Wszystkie mają wspólny sposób działania polegający na blokowaniu mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów przez wiązanie z enzymem dehydrogenazą bursztynianową (inaczej kompleksem II). Enzym SDH (ang. *Succinate Dehydrogenase*) bierze udział w przenoszeniu elektronów pochodzących z bursztynianu bezpośrednio do ubichinonu. Hamowanie łańcucha transportu elektronów zatrzymuje w konsekwencji produkcję trifosforanu adenozy (ATP) i ostatecznie zamyka źródło energii metabolizmu i wzrostu grzybów (Avenot i Michailides 2010). Do grupy fungicydów – inhibitorów dehydrogenazy bursztynianowej badanych w niniejszej pracy należą:

- Fluopyram (nazwa według IUPAC *N*-[2-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridyl]ethyl]- α,α,α -trifluoro-ortho-toluamide) jest substancją czynną fungicydów o szerokim spektrum działania, należy do klasy benzamidów (Rys. 6). Jest aktywny biologicznie na wszystkich etapach wzrostu grzybów, od kiełkowania zarodników do produkcji przetrwalników, a jego spektrum działania obejmuje kilka ważnych dla rolnictwa patogenów, w tym powodujących szarą pleśń i mączniaka prawdziwego występujących na roślinach warzywnych, ziarnkowych i pestkowych (Veloukas i Karaoglanidis 2012).



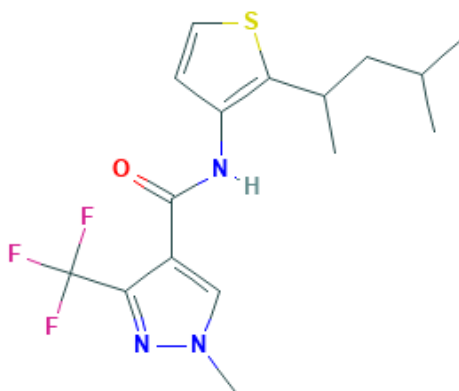
Rysunek 6. Struktura chemiczna fluopyramu (PubChem)

- Boskalid (nazwa według IUPAC 2-chloro-*N*-(4'-chlorobiphenyl-2-yl)nicotinamide), należy do klasy karboksamidów (Rys. 7). Jest inhibitorem kiełkowania konidialnego, hamuje również wzrost grzybni (Kim i Xiao 2010). Jest substancją czynną fungicydów aktywnych wobec szerokiego zakresu patogenów grzybowych, w tym *Botrytis* spp., *Alternaria* spp. i *Sclerotinia* spp. (Kim i Xiao 2011). Wykorzystywany w szerokiej gamie upraw, w tym owoców, warzyw i roślin ozdobnych.



Rysunek 7. Struktura chemiczna boskalidu (PubChem)

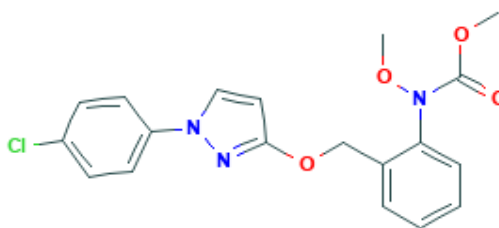
- Pentiopirad (nazwa według IUPAC 1-methyl-*N*-[2-(4-methylpentan-2-yl)thiophen-3-yl]-3-(trifluoromethyl)pyrazole-4-carboxamide), należy do klasy karboksamidów. Jego działanie polega na hamowaniu funkcji mitochondrialnych (Rys. 8). Ma szerokie spektrum zastosowania w zapobieganiu chorob pochodzenia grzybowego, w zwalczaniu parcha jabłoni, mączniaka prawdziwego i szarej pleśni.



Rysunek 8. Struktura chemiczna penthiopiradu (PubChem)

Fungicydy z grupy QoI są skuteczne w hamowaniu kiełkowania zarodników, wzrostu grzybnii i sporulacji docelowych patogenów grzybowych. Ze względu na ich szerokie spektrum działania na główne grupy grzybów chorobotwórczych, inhibitory chinonowe są szeroko stosowane w rolnictwie. Sposób działania obejmuje hamowanie oddychania mitochondrialnego przez wiązanie w miejscu Q_o kompleksu enzymu cytochromu bc1 (znanego również, jako kompleks III). Hamowanie oddychania mitochondrialnego następuje przez blokowanie transferu elektronów między cytochromem b i cytochromem c1 (Bardas i in. 2010, Verloukas i in. 2014). Do tej grupy fungicydów należy:

- Pyraklostrobina (nazwa według IUPAC methyl {2-[1-(4-chlorophenyl)pyrazol-3-yloxymethyl]phenyl}(methoxy)carbamate) należy do klasy estrów karbaminianowych. Stosowana jest do zwalczania głównych patogenów roślinnych, w tym *Septoria tritici*, *Puccinia* spp. i *Pyrenophora teres* (Rys. 9). W ochronie jabłoni stosowana głównie przed patogenami powodującymi gorzką zgniliznę.

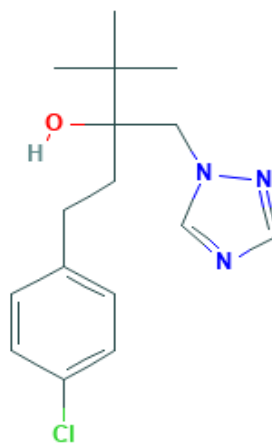


Rysunek 9. Struktura chemiczna pyraklostrobiny (PubChem)

Fungicydy z grupy DMI nazywane również inhibitorami biosyntezy steroli (SBI), stosuje się przeciwko szerokiemu spektrum patogenów grzybowych. Sterol grzybowy (ergosterol) odgrywa ważną rolę strukturalną i sygnalizacyjną w błonach komórkowych grzybów. Fungicydy DMI hamują 14α -demetylację sterolu, wiążąc się selektywnie z 14α -demetylazą sterolową cytochromu P450 (CYP51), która to kombinacja zapobiega pozyskiwaniu substratu przez enzym i późniejszą aktywację tlenu, który uczestniczy w procesie usuwania grupy metylowej

(C-14) z cząsteczki sterolu. Powoduje to wyczerpanie ergosterolu, głównego składnika błon grzybów, oraz wysoką akumulację, potencjalnie toksycznych związków pośrednich sterolu, zmieniając w ten sposób strukturę i funkcję błony komórkowej (Lopez–Ruiz i in. 2010). Do tej grupy fungicydów należy:

- Tebukonazol (nazwa według IUPAC 1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol z klasy triazoli (Rys. 10), to fungicyd o szerokim spektrum działania. Jest wysoce skuteczny w zwalczaniu patogenów grzybowych roślin owocowych i warzywnych. Ma zastosowanie w ochronie jabłoni przeciw mączniakowi prawdziwemu.



Rysunek 10. Struktura chemiczna tebukonazolu (PubChem)

Zastosowane w badaniach substancje czynne wchodzą w skład preparatów: Luna Experience 400 SC (substancje czynne: fluopiram i tebukonazol), Bellis 38 WG (substancje czynne: boskalid i pyraklostrobina) oraz Fontelis 200 SC (substancja czynna: pentiopirad). Należą do grupy związków organicznych. Posiadają zróżnicowane właściwości fizykochemiczne (Tab. 2), budowę chemiczną (Rys. 6-10) oraz różne właściwości toksykologiczne (Tab. 3).

Tabela 2. Właściwości fizykochemiczne badanych substancji czynnych (PPDB)

		Fluopyram	Tebukonazol	Boskalid	Pyraklostrobina	Penthiopirad
Wzór sumaryczny		$C_{16}H_{11}ClF_6N_2O$	$C_{16}H_{22}ClN_3O$	$C_{18}H_{12}Cl_2N_2O$	$C_{19}H_{18}ClN_3O_4$	$C_{16}H_{20}F_3N_3OS$
Grupa chemiczna		benzamid	triazole	karboksyamid	estry karbaminianowe	karboksyamid
Sposób działania		SDHI	DMI	SDHI	QoI	SDHI
Masa molowa [g/mol]		396,76	307,82	343,21	387,80	359,40
Rozpuszczalność w wodzie [mg/l]		16,0	36,0	4,6	1,9	1,375
Współczynnik podziału oktanol-woda K_{ow} pH=7 t = 20°C	P	$2,00 \times 10^3$	$5,01 \times 10^7$	$9,12 \times 10^2$	$9,77 \times 10^3$	$4,17 \times 10^4$
	logP	3,30	3,70	2,96	3,99	4,62
Klasyfikacja oporności na grzyby (według FRAC)		7	3	7	11	7
Temperatura topnienia [°C]		117,5	105,0	143,3	64,5	108,7
Temperatura wrzenia [°C]		318	>350	>300	>200	>314
Temperatura rozkładu [°C]		300	350	300	200	314
Degradacja w glebie $t_{1/2}$	typowa	309	63	200	32	121,5
	w laboratorium [20°C]	309	365	246	62	121,5
	w polu	118,8	47,1	118	32	9,2
Szybkość zanikania na/w roślinie [dni]		6,5	13,6	5,1	4,7	3,1
Współczynnik biokoncentracji	BCF [l/kg]	18	78	107	706	186
	CT ₅₀ [dni]	3,4	2,0	1,0	bd	0,65

bd – brak danych

Tabela 3. Właściwości toksykologiczne badanych substancji czynnych (PPDB)

		Fluopyram	Tebukonazol	Boskalid	Pyraklostrobina	Pentiopirad
Ssaki LD ₅₀ ostra dawka doustna		>2000	1700	> 5000	>5000	>2000
Ssaki krótkoterminowy NOEL [mg/kg]	[mg/kg]	bd	>10,8	5,0	bd	bd
	[ppm]	bd	>100	bd	bd	bd
ADI [mg/kg masy ciała/dzień]		0,012	0,03	0,04	0,03	0,10
ARfD [mg/kg masy ciała/dzień]		0,50	0,03	bd	0,03	0,75
Mutagen		bd	bd	X	X	?
Kancerogen		X	?	?	X	X
Substancja zakłócająca funkcjonowanie układu hormonalnego		bd	bd	X	X	bd
Wpływ na rozmnażanie się/rozwój		?	+	?	+	+
Inhibitor acetylocholinoesterazy		bd	X	X	X	X
Neurotoksant		?	X	X	X	?
Drażniący drogi oddechowe		bd	X	X	+	X
Drażniący skórę		X	X	X	+	X
Drażniący oczy		X	+	X	X	bd
Zagadnienia związane ze zdrowiem człowieka		Możliwe działanie toksyczne na wątrobę, tarczycę i krew.	Substancja działająca toksycznie na wątrobę i układ krwionośny. Prawdopodobne działanie rakotwórcze.	Substancja działająca toksycznie na wątrobę i tarczycę. Prawdopodobne działanie rakotwórcze.	bd	Możliwe działanie toksyczne na wątrobę. Prawdopodobne działanie rakotwórcze.
Klasyfikacja WHO		bd	II	U	bd	bd

+ – wiadomo, że wykazuje działanie

X – wiadomo, że nie wykazuje działania

? – prawdopodobnie wykazuje działanie, jednak brak jest danych potwierdzających

bd – brak danych

Aktywność biologiczna związku chemicznego wiąże się bezpośrednio z jego cechami fizykochemicznymi. Ważnym parametrem w przewidywaniu rozprzestrzeniania się ksenobiotyków w środowisku jest lipofilowość. Charakteryzuje ona powinowactwo związku chemicznego do fazy organicznej (lipidowej) i wodnej. Miarą lipofilowości jest stosunek równowagowych stężeń rozpuszczonej substancji w układzie dwufazowym, który składa się z dwóch niemieszających się rozpuszczalników. Określany jest za pomocą współczynnika K_{ow} (oktanol–woda). Wysoka wartość współczynnika K_{ow} koresponduje z niską rozpuszczalnością w wodzie i wysoką wartością współczynnika biokoncentracji (BCF, ang. *Bioconcentration Factor*) (Wołejko i in. 2016). Badane w niniejszej pracy związki charakteryzują się niską rozpuszczalnością w wodzie (< 50 mg/l w temp. 20°C). Najniższą rozpuszczalność wykazuje pentiopirad – 1,375 mg/l, natomiast najwyższą tebukonazol – 36,0 mg/l.

Praktyczne znaczenie lipofilowości umożliwia przewidywanie, w jakim stopniu dany związek będzie miał skłonność do gromadzenia się w tkankach organizmów żywych. Im bardziej substancja jest lipofilowa, tym większa jest tendencja do jej gromadzenia w organizmie. Zdolność do biokoncentracji określana jest za pomocą BCF. Spośród badanych substancji czynnych, najmniejszą zdolność do biokoncentracji wykazuje fluopyram, którego wartość BCF wynosi 18 l/kg, natomiast największą wartością BCF wynoszącą 706 l/kg charakteryzuje się pyraklostrobina.

Fluopyram, boskalid i pentiopirad charakteryzują się dużą trwałością w glebie, czas ich połowicznego rozkładu ($t_{1/2}$) wynosi 121,5-365 dni. Dla dwóch pozostałych substancji czynnych, tebukonazolu i pyraklostrobiny $t_{1/2}$ w glebie wynosi odpowiednio 63 dni i 32 dni. Biorąc pod uwagę szybkość zanikania na/w roślinie wartość $t_{1/2}$ jest w granicach od 3,1 dnia dla pentiopiradu do 13,6 dnia dla tebukonazolu.

Z kolei biorąc pod uwagę właściwości toksykologiczne najniższą wartość LD_{50} na poziomie 1700 wykazuje tebukonazol, natomiast największą >5000 boskalid i pyraklostrobina. Najniższa wartość dopuszczalnego dziennego pobrania ADI (ang. *Acceptable Daily Intake*) została określona dla fluopyramu 0,012 mg/kg masy ciała/dzień, natomiast najwyższa dla pentiopiradu 0,10 mg/kg masy ciała/dzień. Wartości ostrej dawki referencyjnej ARfD (ang. *Acute Reference Dose*) wynoszą od 0,03 mg/kg masy ciała/dzień dla fluopyramu i pyraklostrobiny do 0,75 mg/kg masy ciała/dzień dla pentiopiradu. Dla boskalidu nie została określona wartość ARfD.

Dla tebukonazolu, pyraklostrobiny i pentiopiradu wykazano wpływ na rozmnażanie się i rozwój organizmów, dodatkowo pyraklostrobina wykazuje działanie drażniące na drogi oddechowe i skórę, a tebukonazol działanie drażniące na oczy. Dla badanych substancji czynnych brak jest szczegółowych danych na temat działania mutagennego lub kancerogennego, a także

wpływu na funkcjonowanie układu hormonalnego, nie są także inhibitorami acetylocholinoesterazy.

Pozostałości środków ochrony roślin w jabłkach

W sadach jabłoniowych, stosuje się dużą liczbę pestycydów szczególnie do ochrony roślin przed chorobami pochodzenia grzybowego (Szymczak i in. 2016). W jednym okresie wegetacyjnym wykonuje się ok. 20-30 zabiegów preparatami chemicznymi. Stosowanie chemicznych środków ochrony roślin, będące efektywnym sposobem ochrony roślin sadowniczych przed chorobami, wiąże się jednak z ryzykiem wystąpienia pozostałości pestycydów w owocach. Duże ryzyko obecności pozostałości pestycydów w jabłkach stwarzają szczególnie fungicydy zastosowane w okresie przedzbiorczym (7-21 dni) przeciwko chorobom przechowalniczym.

Ochrona jabłoni przed chorobami, oparta jest przede wszystkim na metodzie chemicznej, powinna być zatem prowadzona racjonalnie i uwzględniać fazy rozwojowe patogenów, stopień nasilenia chorób, dobór i działanie pestycydów oraz warunki atmosferyczne (Sobiczewski 2013). Paradoksalnie, zaniechanie stosowania fungicydów może prowadzić do infekcji owoców, a w efekcie do występowania mikotoksyn – związków organicznych o wiele bardziej toksycznych niż składniki czynne obecnie stosowanych pestycydów. Stąd, stosowanie fungicydów, zwłaszcza w gospodarstwach komercyjnych, jest obecnie konieczne nie tylko z gospodarczego punktu widzenia, ale także ze względu na zdrowie konsumentów (Piechowicz i in. 2016).

Obecnie istnieje zapotrzebowanie na żywność o niskiej lub bez zawartości chemicznych środków ochrony roślin. Ocena pozostałości środków ochrony roślin w produktach spożywczych, w tym w owocach, w ostatnich latach stanowi ważną strategię wśród organów państwowych odpowiedzialnych za kontrolę dopuszczalnych poziomów pozostałości pestycydów oraz bezpieczeństwo żywności. Monitorowanie pozostałości pestycydów w żywności ma na celu nie tylko sprawdzenie zgodności z najwyższymi dopuszczalnymi poziomami pozostałości (Rozporządzenie WE 396/2005) i prawidłowości użycia środków ochrony roślin (Dyrektywa WE 128/2009, Rozporządzenie WE 1107/2009), ale również ocenę narażenia konsumentów na pozostałości substancji czynnych pestycydów (Nowacka i in. 2015, Struciński i in. 2006, Struciński i in. 2007).

Zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa, kontrola prawidłowości stosowania środków ochrony roślin, a także zapobieganie wprowadzania do obrotu płodów rolnych, które stwarzają zagrożenie dla zdrowia, prowadzone są zgodnie z poniższymi aktami prawnymi:

- Ustawa z dnia 8 marca 2013 o środkach ochrony roślin (t.j. Dz. U. z 2018 r. poz. 1310, 1616, 1629, z 2019 r. poz. 235) (Ustawa 2013);
- Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (t.j. Dz.U. 2019 poz. 1252) (Ustawa 2006);
- Rozporządzenie nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności (Rozporządzenie WE 178/2002);
- Rozporządzenie nr 396/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości pestycydów w żywności i paszy pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz na ich powierzchni, zmieniające dyrektywę Rady 91/414/EWG (Rozporządzenie WE 396/2005).

Ustawa z dnia 8 marca 2013 roku (Ustawa 2013) o środkach ochrony roślin oraz przepisy Unii Europejskiej, w szczególności rozporządzenie 1107/2009 (Rozporządzenie WE 1107/2009) nakładają obowiązek sprawowania kontroli nad stosowaniem środków ochrony roślin w produkcji roślinnej, a także prowadzenia badań pod kątem obecności pozostałości substancji czynnych środków ochrony roślin.

Aktem prawnym normalizującym zagadnienia bezpieczeństwa żywności w Polsce jest ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 roku, według której bezpieczeństwo żywności to ogół warunków, które muszą być spełniane, i dotyczących w szczególności:

- stosowanych substancji dodatkowych i aromatów;
- poziomów substancji zanieczyszczających;
- pozostałości pestycydów;
- warunków napromieniania żywności;
- cech organoleptycznych,

oraz działań, które muszą być podejmowane na wszystkich etapach produkcji lub obrotu żywnością w celu zapewnienia zdrowia i życia człowieka (Ustawa 2006).

Urzędowa kontrola żywności prowadzona jest przez inspekcje podlegające Ministrowi Rolnictwa i Rozwoju Wsi: Inspekcję Ochrony Roślin i Nasiennictwa, Inspekcję Weterynaryjną, Inspekcję Jakości Handlowej Artykułów Rolno – Spożywczych, natomiast nadzór nad handlem żywnością prowadzi Inspekcja Sanitarna podlegająca Ministrowi Zdrowia.

Zasady prowadzenia urzędowych kontroli, a także monitoringu żywności w zakresie pozostałości substancji czynnych pestycydów określa rozporządzenie 396/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 lutego 2005 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów

pozostałości pestycydów w żywności i paszy pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz na ich powierzchni, zmieniające dyrektywę Rady 91/414/EWG. Według powyższego rozporządzenia, w oparciu o wykazy najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości substancji czynnych środków ochrony roślin, prowadzi się ocenę ich pozostałości w produktach spożywczych (Rozporządzenie WE 396/2005).

W 2018 roku w badaniach przeprowadzonych przez Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach przebadano łącznie 282 próbki jabłek na obecność 436 substancji czynnych środków ochrony roślin. W 51 próbkach (18%) nie wykryto pozostałości poszukiwanych środków ochrony roślin. W pozostałych próbkach stwierdzono pozostałości 25 insektycydów i 18 fungicydów. Najczęściej wykrywano kaptan (67,7% – badanych próbek), acetamipryd (50,0%), ditiokarbaminiany (31,6%), boskalid (16,3%), karbendazym (13,8%), metoksyfenozyd (12,8%), pyraklostrobinę (12,1%), tebukonazol (12,1%) i spirodiklofen (10,6%). W 200 próbkach jabłek (ok. 71%) stwierdzono pozostałości więcej niż jednej substancji czynnej. W dwóch próbkach wykryto pozostałości 10 związków, w trzech – 9, w pięciu – 8, w 18 próbkach wykryto pozostałości 7 substancji czynnych, w 17 – 6, w 31 – 5, w 43 – 4, w 42 – 3 i w 39 – 2 substancji czynnych. W 11 próbkach (4%) stwierdzono obecność pozostałości substancji czynnych preparatów, które nie zostały zarejestrowane do stosowania w uprawie jabłoni tj: dimetoatu, ometoatu, bifentryny, diflubenzuronu, fenazachiny, pirydabenu, flutriafolu i tiabendazolu. W czterech próbkach (1,4%) stwierdzono przekroczenie dopuszczalnego poziomu chloropiryfosu (2 próbki) i bifentryny (2 próbki), dla których wystawiono zgłoszenia w Krajowym Systemie Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznej Żywności (RASFF, ang. *Rapid Alert System for Food and Feed*) (Miszczak 2018).

Degradacja pestycydów w środowisku

Bardzo ważną cechą pestycydów jest ich trwałość w środowisku naturalnym, glebie, na powierzchni roślin oraz w organizmach roślinnych i zwierzęcych. Wpływa ona nie tylko na skuteczność ich działania, ale także decyduje o tym, czy produkty rolne mogą być bezpiecznie konsumowane przez człowieka. Określana jest ona za pomocą czasu połowicznego zanikania DT_{50} lub $t_{1/2}$. Większość pestycydów wykazuje ograniczoną trwałość w ekosystemach, a te najbardziej trwałe (pestycydy chloroorganiczne – DDT, aldryna), których czas połowicznego rozkładu wynosi od kilku do kilkudziesięciu lat, zostały wycofane i zabroniono ich stosowania w wielu krajach (Klaassen i Watkins 2014).

Zmiany stężeń substancji czynnych środków ochrony roślin w czasie określa kinetyka zanikania, która zależy od wielu czynników, m.in. od budowy i właściwości chemicznych substancji

czynnych, rodzaju rośliny, na którą jest aplikowany preparat, czy rodzaju gleby, jej odczynu w tym zawartości związków mineralnych i organicznych. Istotnymi czynnikami wpływającymi na degradację pestycydów są również warunki klimatyczne: temperatura i wilgotność powietrza, opady oraz promieniowanie UV (Biziuk 2001).

Degradacja zachodzi przede wszystkim w wyniku przemian biochemicznych, ale także jest wynikiem reakcji chemicznych: utleniania, redukcji i podstawienia nukleofilowego (hydroliza). Ważne są także przemiany zachodzące pod wpływem energii świetlnej, czyli reakcje fotochemiczne. Znaczącym czynnikiem wpływającym na degradację są przemiany będące następstwem procesów fizycznych: parowania i sublimacji (Biziuk 2001).

Ze względu na mnogość, bardzo trudne jest określenie wszystkich czynników wpływających na kinetykę degradacji pestycydów oraz na zachodzące podczas degradacji procesy, stąd omówiono tylko wybrane.

Budowa chemiczna substancji czynnej jest istotnym czynnikiem wpływającym na kinetykę zanikania. Na jej podstawie można przewidzieć ogólne prawidłowości:

- Pestycydy polarne są szybciej degradowane od związków niepolarnych, ze względu na lepszą rozpuszczalność w wodzie, a także ze względu na wydajniejszą adsorpcję tych związków przez substancje organiczne zawarte w glebie;
- Połączenia aromatyczne, posiadające struktury pierścieniowe są trwalsze od alifatycznych, które mają strukturę łańcuchową;
- Związki zawierające aktywne atomy chloru łatwiej ulegają podstawieniu nukleofilowemu, m.in. hydrolizie;
- W przypadku związków jonowych, łatwiej ulegają degradacji połączenia anionowe niż kationowe;
- Związki posiadające wysoki stopień utlenienia wykazują odporność na utlenianie, są też mało atrakcyjnym źródłem energii dla mikroorganizmów aerobowych, jednak mogą ulegać redukcji w warunkach beztlenowych. Natomiast związki o dużym stopniu zredukowania łatwo ulegają przemianom w warunkach aerobowych (Róžański 1992).

Istotnym czynnikiem są właściwości fizyko-chemiczne substancji czynnych. Degradacja jest następstwem procesów fizycznych: parowania i sublimacji. Szybkość parowania związku, uzależniona jest od jego lotności. Kluczową rolę odgrywa także temperatura, z reguły jej wzrost zwiększa szybkość przemian pestycydów. Związane jest to również ze wzrostem aktywności mikroorganizmów glebowych, a także szybkości reakcji chemicznych, przy jednoczesnym zmniejszeniu adsorpcji na powierzchni cząstek glebowych. Zmiana odczynu gleby w kierunku

większego zakwaszenia zwiększa trwałość pestycydów, natomiast zmiana do odczynu alkalicznego hamuje procesy biotyczne i przyspiesza przebieg procesów chemicznych (Biziuk 2001).

Ważnym aspektem jest również anatomia rośliny, na którą jest aplikowany preparat. Przy nalistnym stosowaniu środka istotną rolę odgrywa budowa powierzchni rośliny. Rośliny pokryte włosami gromadzą większe ilości preparatów pylistych i płynnych. Z kolei do tych pokrytych warstwą woskową łatwiej przenikają i gromadzą się w nich związki o charakterze hydrofobowym. Natomiast w przypadku związków dobrze rozpuszczalnych w wodzie ta kumulacja jest utrudniona.

Istotny wpływ na poziom stężenia substancji czynnych w płodach rolnych ma wzrost jadalnych części rośliny (rozcieńczenie biologiczne), jak również szybkość podawania preparatu na roślinę oraz czas, jaki upłynął od dnia zabiegu do zbioru (rzeczywisty zanik pozostałości), dlatego można spodziewać się stosunkowo wyższych pozostałości, gdy dana substancja zostanie zastosowana bezpośrednio przed zbiorami (Sadło i in. 2016b).

Duży wpływ na zanikanie pestycydów mają mikroorganizmy. W wyniku ich naturalnego metabolizmu przetwarzają substancje organiczne zawarte w zasiedlanym przez nie środowisku. Wykorzystują pestycydy jako źródło energii i/lub budulec. Wynika to z aktywności enzymów konstytucyjnych. W przypadku obecności ksenobiotyku, mikroorganizmy są również zdolne do wytwarzania enzymów indukowanych. Taka odpowiedź drobnoustroju jest mechanizmem adaptacyjnym umożliwiającym im przetrwanie w zmienionych warunkach wegetacyjnych. Tylko nieliczne pestycydy są odporne na działanie enzymów wytwarzanych przez mikroorganizmy. Może wynikać to z braku wystarczającego potencjału biologicznego wykazywanego przez daną populację mikroorganizmów, z hamującego działania ksenobiotyku na układy enzymatyczne, właściwości wynikających ze struktury chemicznej pestycydu uniemożliwiających atakowanie cząsteczki przez enzym czy niemożliwości przenikania pestycydu przez błonę komórkową (Różański 1992).

Największą aktywnością w degradowaniu pestycydów mają bakterie z rodzaju *Arthobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium* i *Pseudomonas*, promieniowce z rodzaju *Nocardia* i *Streptomyces* oraz grzyby z rodzaju *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* i *Trichoderma* (Różański 1992).

Biologiczna ochrona roślin, w tym jabłoni

Wzrastająca świadomość społeczeństwa dotycząca zagrożeń dla zdrowia człowieka i bezpieczeństwa środowiska związanych ze stosowaniem chemicznych środków ochrony roślin, przyczyniła się do zwiększenia podejmowanych działań, które mają na celu ograniczenie ryzyka

w tym zakresie. Częste stosowanie pestycydów, oprócz zwiększania kosztów produkcji, może także wpływać na zwiększanie odporności na agrofagi (Zamojska i Malinowski 2012). Nie można pominąć również wpływu na środowisko tj. zanieczyszczenie wody, gleby i powietrza, co może powodować ekologiczny brak równowagi poprzez tłumienie populacji korzystnej mikroflory. Zatem, w takim kontekście biologiczne środki ochrony roślin można rozpatrywać jako alternatywę w ochronie upraw.

Zgodnie z obecną polityką Unii Europejskiej, mającą na celu zmniejszenie ryzyka związanego ze stosowaniem pestycydów, opracowano działania promujące wdrażanie integrowanych systemów ochrony roślin, których celem jest odpowiednie wykorzystanie środków ochrony roślin ukierunkowane na faktyczne występowanie zagrożeń upraw. Od 1 stycznia 2014 roku wszyscy profesjonalni użytkownicy środków ochrony roślin mają obowiązek stosowania zasad Integrowanej Ochrony Roślin zgodnie z postanowieniami art. 14 dyrektywy 2009/128/WE oraz rozporządzenia 1107/2009 (Dyrektywa WE 128/2009, Rozporządzenie WE 1107/2009, Ustawa 2013). Podstawą zintegrowanego systemu ochrony jest wykorzystanie w pierwszej kolejności metod niechemicznych i innych form interwencji oraz stosowanie środków ochrony roślin na uzasadnionym ekologicznie i ekonomicznie poziomie.

Na ograniczenie występowania i nasilenia chorób istotny wpływ mają zabiegi agrotechniczne: nawożenie i nawadnianie roślin, prześwietlanie i formowanie koron. Stosując metodę mechaniczną można skutecznie ograniczać, a nawet eliminować źródło niektórych chorób w sadzie, co następnie będzie skutkowało zmniejszeniem liczby zabiegów środkami chemicznymi. Najpowszechniej stosowanymi niechemicznymi metodami ochrony są metody biologiczne, wykorzystujące bezpieczne dla środowiska i zdrowia człowieka czynniki biologiczne.

Klasyczna definicja biologicznej ochrony roślin przed chorobami to: ograniczenie rozwoju patogenów za pomocą czynników biologicznych z wyłączeniem hodowli odpornościowej (Malepszy 2014). Te czynniki biologiczne ze względu na pochodzenie, można podzielić na dwie grupy: naturalnie występujące w środowisku i/lub celowo do niego wprowadzane (w tym klasyczna metoda biologiczna czy bioaugmentacja).

Do czynników biologicznych zaliczane są mikroorganizmy konkurencyjne, a także patogenne w stosunku do agrofagów: bakterie, grzyby, pierwotniaki, pożyteczne makroorganizmy (roztocza i drapieżne owady), wirusy (wchodzące w skład preparatów insektycydowych), substancje naturalne pochodzenia roślinnego (ekstrakty/wyciągi), zwierzęcego (molekuły) oraz semiozwiązki (feromony).

Bakterie wykorzystywane w biologicznej ochronie należą do grupy bakterii stymulujących wzrost roślin (PGPR, ang. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Przedstawicielami rodzajów bakterii PGPR są: *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderi*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Zoogloea* (Jha i Saraf 2015). Dysponują one mechanizmami, które w sposób bezpośredni i/lub pośredni umożliwiają zwalczanie patogenów oraz wywierają korzystny wpływ na rośliny stymulując ich wzrost. Mają również zdolność do indukowania systemicznej odporności roślin na choroby, a także oddziaływania antagonistycznego na inne mikroorganizmy. Antagonizm obejmuje trzy rodzaje interakcji między organizmami: antybiozę, współzawodnictwo o pokarm i miejsce oraz pasożytnictwo, natomiast indukowana systemiczna odporność jest związana z takim współdziałaniem między rośliną a bakterią, które prowadzi do stymulacji reakcji obronnych rośliny, skutkującym ograniczeniem wzrostu i rozwoju patogenu, a nawet jego eliminacją (Malepszy 2014).

Rodzaj *Bacillus* spp. stanowią gram dodatnie ruchliwe komórki o walcowym, cylindrycznym kształcie, mogą być urzęsione perytrychalnie lub biegunowo. Z reguły są katalazododatnie, tlenowe lub względnie beztlenowe. Ze względu na dużą różnorodność genetyczną, posiadają wysoki stopień zróżnicowania fizjologicznego oraz metabolicznego (zawartość guaniny i cytozyny w chromosomalnym DNA wynosząca od 32 do 69%) (Szczęsna–Antczak i Trzmiel 2008). Bakterie z rodzaju *Bacillus* spp. są szeroko rozpowszechnione w naturze. Izolowane są z gleby, wód słodkich oraz słonych. Gatunki z rodzaju *Bacillus* charakteryzują się dużą szybkością wzrostu oraz wydajnym systemem syntezy i sekrecji białek zewnątrzkomórkowych (Deb i in. 2013). Posiadają one status GRAS (ang. *Generally Recognized As Safe*), który potwierdza, że są to gatunki bezpieczne dla ludzi i zwierząt. Bakterie *Bacillus* spp. wykorzystuje się do produkcji preparatów komercyjnych, w tym: enzymów, insektycydów, antybiotyków, witamin, a także innych metabolitów (kwas hialuronowy) (Harwood i Cranenburgh, 2008, Schallmey i in., 2004). Bakterie *Bacillus* spp. mogą również degradować substancje czynne pestycydów (Gangola i in. 2018, Sariwati i in. 2017, Gangireddygar i in. 2017).

Zastosowanie grzybów, w biologicznej ochronie roślin polega na wykorzystaniu ich zdolności konkurencyjnych (szybki wzrost, intensywne zarodnikowanie), co pozwala na szybką kolonizację nisz ekologicznych. Przez to ogranicza się liczebność populacji patogenów zasiedlających zarówno glebę, jak i rośliny.

Poza zdolnościami konkurencyjnymi, grzyby antagonistyczne współzawodniczą także z patogenami o składniki odżywcze. Mogą działać poprzez wytwarzanie enzymów litycznych, które rozkładają różne struktury patogenu (zarodniki, przetrwalniki, grzybnię) albo w sposób

bezpośredni poprzez kontakt pasożytniczy (nadpasożytnictwo). Najczęściej w preparatach biologicznych wykorzystywane są szczepy grzybów z rodzajów: *Ampelomyces*, *Candida*, *Coniothyrium*, *Gliocladium*, *Phaeilomyces* i *Trichoderma* (Bryk 2019).

Trichoderma spp. to wolno żyjące grzyby, które są powszechne w ekosystemach glebowych i korzeniowych. Są one oportunistycznymi symbiontami roślin, a także pasożytami innych grzybów. Niektóre szczepy tworzą trwałe i długotrwałe kolonizacje powierzchni korzeni i przenikają do jego naskórka i komórek. Kolonizacja korzeni przez *Trichoderma* spp. często zwiększa również wzrost i rozwój korzeni, wydajność upraw, odporność na stresy abiotyczne oraz pobieranie składników odżywczych (Harman i in. 2004). Ponadto hamują i/lub rozkładają pektynazy i inne enzymy grzybów patogennych roślin, takich jak *Botrytis cinerea* Pers. (Elad 2000). Wytwarzają lub uwalniają różne związki, które indukują miejscowe lub układowe reakcje odpornościowe wśród nich enzymy lityczne i proteolityczne, a także metabolity, które mogą być wykorzystywane jako biologiczne fungicydy do walki z chorobami roślin wywołanymi przez patogenne grzyby (Kubicek i in. 2001, Navazio i in. 2007, Vinale i in. 2009). W celu przetrwania i konkurowania w swojej niszy ekologicznej, grzyby stosują nie tylko „broń” enzymatyczną, ale także „broń” chemiczną, tym samym produkują nie tylko potencjalne antybiotyki (kwas harzianowy, tricholiny, kwas heptelidowy i in.), ale także mikotoksyny m.in. patulinę oraz cytotoksyczne i immunosupresyjne trichoteceny (Malmierca i in. 2012, Nielsen i in. 2005, Vinale i in. 2008). Grzyby z rodzaju *Trichoderma* spp. mogą produkować także inne metabolity, w tym: poliketydy, pyrony, terpeny, polipeptydy, metabolity pochodzące od aminokwasów. Są bardzo odporne na szereg toksycznych substancji między innymi: metale ciężkie, związki metaloorganiczne, fungicydy oraz substancje chemiczne zawierające w swojej strukturze grupę nitrylową (CN). Doniesienia literaturowe podają, że szczepy tych grzybów mają zdolność degradacji pestycydów (Jayaraman i in. 2012, Katayama i Matsumura 1993, Sharma i in. 2016).

Zastosowanie szczepów bakterii *Bacillus* spp. oraz grzyba *Trichoderma* spp. w biologicznej ochronie roślin stanowi naturalną alternatywę dla chemicznych środków ochrony roślin, a także jak podają wyżej wspomniane doniesienia literaturowe może mieć wpływ na degradację pestycydów.

W ostatnich latach rozwija się działalność firm biotechnologicznych produkujących preparaty biologiczne zawierające mikroorganizmy. Na świecie zwiększa się sprzedaż środków ochrony roślin zawierających mikroorganizmy, jednak stanowi ona tylko 2,5% w porównaniu ze sprzedażą środków chemicznych – 3 mld ton (Messing i Brodeur 2018). W Polsce liczba zarejestrowanych biopreparatów jest niewielka, wynosi tylko 13 (Sosnowska 2018). Tak mała ilość preparatów zawierających mikroorganizmy, oferowanych w sprzedaży związana jest z bardzo kosztownym i rygorystycznym procesem rejestracji środka, który odbywa się na podobnych zasadach jak

w przypadku chemicznych środków ochrony roślin (Ravensberg 2011). Sprawia to, że producenci rezygnują z rejestracji, a nawet z wytwarzania takich preparatów (Martyniuk 2012). Znacznie więcej stosuje się preparatów biologicznych – nawozów – zawierających mikroorganizmy, które nie podlegają rygorystycznemu procesowi rejestracji.

2. CEL I ZAKRES PRACY

Celem badań było wyznaczenie w warunkach laboratoryjnych (*in vitro*) stopnia rozkładu wybranych substancji czynnych fungicydów: fluopyramu, tebukonazolu, boskalidu, pyraklostrobiny i pentiopiradu przez szczepy bakterii *Bacillus subtilis* PCM 486 i grzyba *Trichoderma harzianum* KKP 534, a także przez mieszaną kulturę bakterii i grzybów oraz sprawdzenie w warunkach polowych (*in vivo*) czy stosowanie preparatu biologicznego zawierającego szczepy bakterii i grzybów wpływa na rozkład substancji czynnych fungicydów w jabłkach.

Stawiana hipoteza badawcza:

- Bakterie *B. subtilis* i grzyb *T. harzianum* wpływają na rozkład substancji czynnych fungicydów.
- Preparaty biologiczne wpływają na zawartość pozostałości fungicydów w jabłkach.

Zakres pracy obejmował:

1. Zbadanie w warunkach *in vitro* wpływu bakterii *B. subtilis* na degradację substancji czynnych pestycydów: fluopyramu, tebukonazolu, boskalidu, pyraklostrobiny i pentiopiradu.
2. Zbadanie w warunkach *in vitro* wpływu grzyba *T. harzianum* na degradację substancji czynnych pestycydów: fluopyramu, tebukonazolu, boskalidu, pyraklostrobiny i pentiopiradu.
3. Zbadanie w warunkach *in vitro* wpływu mieszanej kultury bakterii *B. subtilis* i grzyba *T. harzianum* na degradację substancji czynnych pestycydów: fluopyramu, tebukonazolu, boskalidu, pyraklostrobiny i pentiopiradu.
4. Zbadanie w warunkach polowych (*in vivo*) wpływu preparatu biologicznego Zumba Plant® na degradację fluopyramu i tebukonazolu – substancji czynnych środka Luna Experience 400 SC. Badania prowadzone w okresie dwóch lat w komercyjnych sadach jabłoniowych w Józefowie nad Wisłą i w Rzeszowie.
5. Zbadanie w warunkach polowych (*in vivo*) wpływu preparatu biologicznego Zumba Plant® na degradację boskalidu i pyraklostrobiny – substancji czynnych środka Bellis 38 WG. Badania prowadzone w okresie dwóch lat w komercyjnych sadach jabłoniowych w Józefowie nad Wisłą i w Rzeszowie.

6. Zbadanie w warunkach polowych (*in vivo*) wpływu preparatu biologicznego Zumba Plant® na degradację pentiopiradu – substancji czynnej środka Fontelis 200 SC. Badania prowadzone w okresie dwóch lat w komercyjnych sadach jabłoniowych w Józefowie nad Wisłą i w Rzeszowie.

3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

W pracy przeprowadzono testy w warunkach laboratoryjnych (*in vitro*) w celu sprawdzenia, czy substancje czynne fungicydów (fluopiram, tebukonazol, boskalid, pyraklostrobina i pentiopirad) ulegają rozkładowi przez szczepy mikroorganizmów wchodzące w skład badanego komercyjnego preparatu Zumba Plant® (NaturalCrop, Warszawa, Polska). Preparat biologiczny zawiera w swoim składzie szczepy: bakterii *B. subtilis*, grzyba *Trichoderma* spp. i *Glomus* spp. Do badań laboratoryjnych jako szczepy referencyjne wytypowano bakterie *B. subtilis* PCM 486 oraz szczepy grzyba *T. harzianum* KKP 534 i poddano je ekspozycji względem testowanych pestycydów. W badaniach laboratoryjnych nie ujęto szczepu *Glomus* spp., ze względu na fakt, że jest to grzyb mikoryzowy i w aplikacji dolistnej preparatu biologicznego (Zumba Plant® jest preparatem uniwersalnym stosowanym zarówno dolistnie jak i doglebowo) nie powinien on wpłynąć na degradację pestycydów. Dodatkowo, brak jest danych literaturowych, dotyczących wpływu grzybów *Glomus* spp. na degradację pestycydów.

Przeprowadzono również badania w warunkach polowych (*in vivo*) w celu sprawdzenia czy aplikowany preparat biologiczny Zumba Plant® wpływa na zmianę stężenia substancji czynnych fungicydów stosowanych na roślinach jabłoni 3 tygodnie przed zbiorem owoców (producent badanego preparatu biologicznego podaje w etykiecie, iż obniża on pozostałości środków ochrony roślin).

3.1 Badania laboratoryjne

W pracy przeprowadzono testy w warunkach laboratoryjnych *in vitro*. Szczepy bakterii *B. subtilis* oraz grzyba *T. harzianum* poddane zostały ekspozycji względem testowanych substancji czynnych pestycydów: fluopiramu, tebukonazolu, boskalidu, pyraklostrobiny i pentiopiradu, w celu oszacowania stopnia ich rozkładu. Przeprowadzono testy w warunkach statycznego kontaktu poprzez inkubację szczepu(ów) z zaaplikowanymi preparatami chemicznymi. Stężenia substancji czynnych w podłożu wynosiły od 64 do 126 µg/ml. Wszystkie testy laboratoryjne prowadzono w 3 powtórzeniach, a stopień degradacji określano w odniesieniu do próbek kontrolnych zawierających w podłożach tylko substancje czynne fungicydów. Schemat doświadczeń dotyczących degradacji pestycydów przedstawiono w tabeli 4.

Dodatkowo oceniono stężenia inhibujące/bójcze badanych substancji czynnych dla bakterii *B. subtilis* i drożdży referencyjnych *S. cerevisiae* oraz żywotność komórek *B. subtilis*.

Tabela 4. Schemat doświadczeń laboratoryjnych dotyczących degradacji pestycydów

Numer doświadczenia	Testowany mikroorganizm	Substancja czynna	Zastosowane podłoże	Stężenie substancji czynnych w podłożu [µg/ml]	Objętość preparatu chemicznego dodana do kolby [ml]
1.	<i>B. subtilis</i>	fluopyram tebukonazol	bulion odżywczy 10-krotnie rozcieńczony	100 100	0,02
2.		boskalid pyraklostrobina		126 64	
3.		pentiopirad		100	
4.	<i>T. harzianum</i>	fluopyram tebukonazol	bulion glukozowo- ziemniaczany	100 100	
5.		boskalid pyraklostrobina		126 64	
6.		pentiopirad		100	
7.	<i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i>	fluopyram tebukonazol	bulion odżywczy 10-krotnie rozcieńczony + bulion glukozowo- ziemniaczany	100 100	0,02
8.		boskalid pyraklostrobina		126 64	
9.		pentiopirad		100	

Odczynniki, podłoża oraz szczepy mikrobiologiczne

- Szczepy referencyjne bakterii *B. subtilis* PCM 486, grzybów *T. harzianum* KKP 534 i *S. cerevisiae* SP4;
- Roztwory wzorców substancji czynnych: fluopyramu, pyraklostrobiny i pentiopiradu (Supelco, Stany Zjednoczone), tebukonazolu i boskalidu (Instytut Przemysłu Organicznego, Polska) o stężeniach od 4 µg/ml do 20000 µg/ml w metanolu;
- Wodne roztwory preparatów chemicznych: Luna Experience 400 SC (Bayer, Niemcy), Bellis 38 WG (BASF, Niemcy) i Fontelis 200 SC (DuPont, Stany Zjednoczone) o stężeniach substancji czynnych od 64000 µg/ml do 126000 µg/ml;
- Bulion odżywczy (BTL, Polska) o składzie: ekstrakt mięsny 2 g/l, ekstrakt drożdżowy 2 g/l, pepton 5 g/l, NaCl 4 g/l, glukoza 10 g/l i 10-krotnie rozcieńczony; w razie potrzeby hodowli szalkowej bulion zestalano agarem (20 g/l);

- Bulion glukozowo – ziemniaczany (PBD, ang. *Potato Dextrose Broth*) (BTL, Polska), skład: ekstrakt ziemniaczany 4 g/l i glukoza 20 g/l; w razie potrzeby hodowli szalkowej bulion zestalano agarem (20 g/l);
- Odczynnik AlamarBlue – sól sodowa resazuryny ($C_{12}H_6NO_4Na$) (Alfa Aesar, Stany Zjednoczone).

Sprzęt i materiały pomocnicze

- Inkubator z wytrząsaniem, model MaxQ 6000 (Thermo Scientific, USA);
- Spektrofluorymetr, model infinite M200 (Tecan, Szwajcaria);
- Kolby Erlenmeyera o poj. 100 ml;
- Pipety automatyczne o poj. 5 ml, 1 ml, 100 μ l;
- Płytki 96 dołkowe.

3.1.1 Ocena stężenia inhibującego/bójącego dla bakterii *B. subtilis*

Dla badanych substancji czynnych fungicydów, wykonano ocenę stężenia inhibującego i/lub bójącego dla bakterii *B. subtilis* – test MIC (ang. *Minimum Inhibitory Concentration*), a dla substancji wykazujących inhibicję wzrostu test MBC (ang. *Minimum Bactericidal Concentration*).

Szczep bakterii *B. subtilis* zaszczerpiono do próbowki z bulionem odżywczym i inkubowano przez 18 godzin w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 150 obr/min. Następnie, na płytce wielodołkowej wsiano szczepy bakterii z 18-to godzinnego inokulum tak, aby gęstość optyczna OD_{600} (ang. *Optical Density*) wynosiła 0,1. Do odpowiednich dołków dodano wzorce substancji czynnych fungicydów o stężeniach w zakresie 0,02-1000 μ g/ml. Kontrolę negatywną stanowiło czyste podłoże, kontrolę pozytywną szczepy bakterii *B. subtilis* w podłożu nie poddane działaniu pestycydów. Wszystkie analizy prowadzono w trzykrotnym powtórzeniu. W czasie „zerowym” wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 600 nm (czytnik typu Tecan), po czym płytki inkubowano przez dalsze 24 godziny z wytrząsaniem w temperaturze 37°C i ponownie mierzono absorbancję. Określono MIC (poprzez spadek wartości absorbancji), a dla substancji wykazujących inhibicję wzrostu wykonano test MBC. W tym celu na szalki z podłożem stałym z odpowiedniego dołka płytki, wysiewano cząstkę hodowlę bakterii *B. subtilis*. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez dalsze 24 godziny. Całkowity brak wzrostu komórek poddanych ekspozycji odpowiedniemu stężeniu związku, odnotowywany był jako wartość bójąca względem testowanego mikroorganizmu.

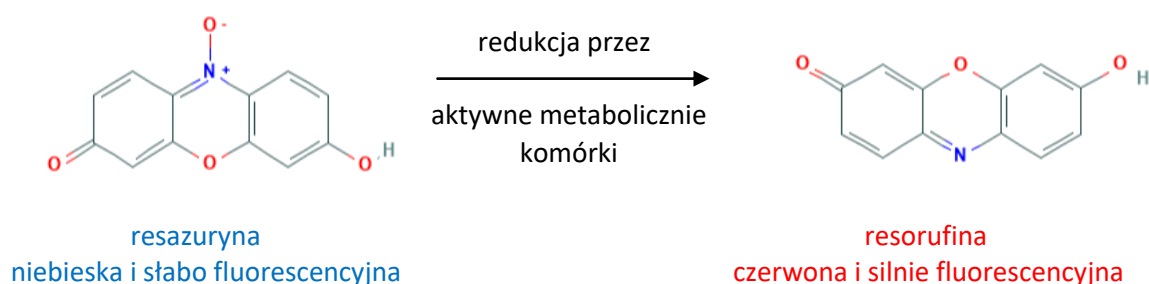
3.1.2 Degradacja pestycydów przez bakterie *B. subtilis*

Szczepki bakterii *B. subtilis* zaszczipiono do próbowki zawierającej bulion odżywczy i inkubowano przez 18 godzin w temperaturze 37°C. Badania degradacji przeprowadzono w kolbach Erlenmeyera o poj. 100 ml zawierających 20 ml jałowego bulionu odżywczego 10-krotnie rozcieńczonego, do których dodano roztwory preparatów chemicznych uzyskując końcowe stężenie substancji czynnych w zakresie 64-126 µg/ml (Tab. 4). 18 godziną hodowlą *B. subtilis* dodano do podłoża, tak aby uzyskać wartość OD w granicy 0.7-1. Próbkę kontrolną stanowiło podłoże płynne z roztworami preparatów chemicznych. Kolby inkubowano w inkubatorze z wytrząsaniem 100 obr/min. Doświadczenia prowadzono w reżimie czasowym (14 dni) i temperaturowym (30±2°C). Z inkubowanych kolb okresowo pobierano próbki – do analiz chemicznych w celu określenia stężeń substancji czynnych oraz do oceny aktywności metabolicznej komórek.

Z próbek pobranych do analiz chemicznych, ekstrahowano badane substancje czynne fungicydów, a uzyskane ekstrakty poddano analizie techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Do oceny żywotności komórek wykorzystano testy z użyciem odczynnika AlamarBlue.

3.1.3 Ocena żywotności komórek *B. subtilis*

Z każdej próbki, która poddawana była ocenie aktywności metabolicznej komórek, pobierano w warunkach sterylnych 180 µL hodowli i umieszczano na czarnej płytce 96 dołkowej. Następnie dodawano po 20 µL odczynnika AlamarBlue o stężeniu 0,01%, po czym inkubowano w ciemności przez 10 min. Następnie wykonano pomiar fluorescencji przy długości fali wzbudzenia 560 nm i emisji 590 nm. Schemat metabolizmu komórek przedstawiono na rysunku 11.



Rysunek 11. Schemat metabolizmu komórek z wykorzystaniem odczynnika AlamarBlue (Rampersad 2012)

3.1.4 Ocena stężenia inhibującego/bójczego wobec grzyba referencyjnego *S. cerevisiae*

Dla badanych substancji czynnych fungicydów, wykonano ocenę stężenia inhibującego i/lub bójczego dla grzyba *S. cerevisiae* – test MIC (ang. *Minimum Inhibitory Concentration*), a dla substancji wykazujących inhibicję wzrostu test MFC (ang. *Minimum Fungicidal Concentration*).

W celu oszacowania oddziaływania wybranych fungicydów na grzyby, poddano je inkubacji wraz z wybranym referencyjnym szczepem *S. cerevisiae* SP4, który zaszczepiono do probówki zawierającej bulion glukozowo – ziemniaczany i inkubowano przez 18 godzin w temperaturze 30°C z wytrząsaniem 150 obr/min. Następnie, na płytce wielodołkowej wsiano szczepy grzyba z nocnego inokulum, tak aby OD₆₀₀ wynosiła 0,1. Do odpowiednich dołków dodano wzorce substancji czynnych fungicydów o stężeniach w zakresie 0,02-1000 µg/ml. Kontrolę negatywną stanowiło czyste podłoże, kontrolę pozytywną szczepy grzyba nie poddane działaniu pestycydów. Wszystkie analizy prowadzono w trzykrotnym powtórzeniu. W czasie „zerowym” wykonano pomiar absorbancji przy fali długości 600 nm (czytnik typu Tecan), po czym płytki inkubowano przez dalsze 24 godziny z wytrząsaniem w temperaturze 30°C i ponownie zmierzono absorbancję. Określono MIC, a dla substancji wykazujących inhibicję wzrostu wykonano test MFC.

3.1.5 Degradacja pestycydów przez grzyba *T. harzianum*

Badania degradacji przeprowadzono w kolbach Erlenmeyera o poj. 100 ml zawierających 20 ml jałowego bulionu glukozowo – ziemniaczanego z roztworami preparatów chemicznych uzyskując końcowe stężenie substancji czynnych w zakresie 64-126 µg/ml (Tab. 4). Grzyba *T. harzianum* dodano do podłoża zawierającego roztwór preparatów chemicznych. Próbkę kontrolną stanowiło podłoże z roztworami preparatów chemicznych. Kolby inkubowano w inkubatorze z wytrząsaniem 100 obr/min. Doświadczenia prowadzono w reżimie czasowym (14 dni) i temperaturowym (28±1°C). Z inkubowanych kolb okresowo pobierano w warunkach sterylnych próbki do analiz, z których ekstrahowano badane substancje czynne fungicydów i poddano je analizie techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas.

3.1.6 Degradacja pestycydów przez mieszaną kulturę bakterii *B. subtilis* i grzyba *T. harzianum*

Badania degradacji przeprowadzono w 100 ml kolbach Erlenmeyera zawierających 10 ml jałowego bulionu 10-krotnie rozcieńczonego i 10 ml jałowego bulionu glukozowo –

ziemniaczanego z roztworami preparatów chemicznych uzyskując końcowe stężenie substancji czynnych w zakresie 64-126 µg/ml (Tab. 4). Bakterie i grzyby dodano do podłoża zawierającego roztwór preparatów chemicznych. Próbkę kontrolną stanowiło podłoże z roztworami preparatów chemicznych. Kolby inkubowano w inkubatorze z wytrząsaniem 100 obr/min. Doświadczenia prowadzono w reżimie czasowym (14 dni) i temperaturowym ($28 \pm 1^\circ\text{C}$). Z inkubowanych kolb okresowo pobierano w warunkach sterylnych próbki do analiz, z których ekstrahowano badane substancje czynne fungicydów i poddano je analizie techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas.

3.2 Badania polowe

3.2.1 Obiekty doświadczalne

Badania wykonano w dwóch gospodarstwach sadowniczych: 6 hektarowym położonym w Rzeszowie, gdzie nasadzenia drzew między rzędami były w odległości 2,5 metra, a odległości pomiędzy drzewami w rzędzie wynosiły 1,5 metra, oraz w 60 hektarowym gospodarstwie w Józefowie nad Wisłą, w którym nasadzenia drzew między rzędami były w odległości 4 metrów, natomiast między drzewami wynosiły 1,25 metra (Rys. 12a i b). Badania polowe przeprowadzono w latach 2016, 2017 i 2018 na 5 odmianach jabłoni: Red Jonaprince, Gloster, Gloden Delicious, Boskoop i Gala. W obu sadach, zgodnie z zasadami dobrej praktyki rolniczej, w całym okresie wegetacji były wykonywane standardowe działania rolnicze, w tym: przycinanie drzew, nawożenie oraz zabiegi pielęgnacyjne.



Rysunek 12. Sad w (a) Rzeszowie i (b) w Józefowie nad Wisłą (fot. M. Podbielska)

3.2.2 Aplikacja preparatów chemicznych i biologicznych

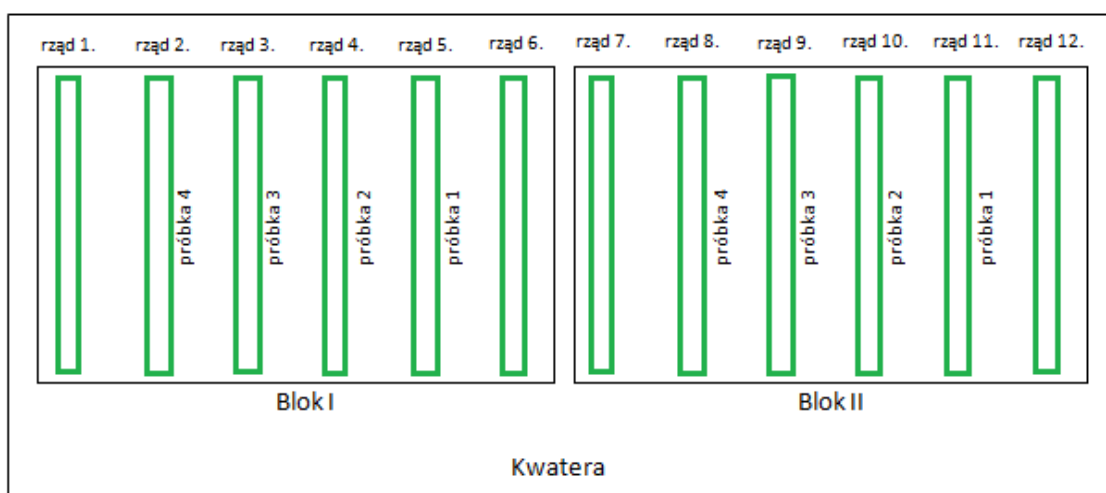
Zabiegi zarówno preparatami chemicznymi jak i biologicznymi przeprowadzali wykwalifikowani pracownicy gospodarstw sadowniczych, zgodnie z zaleceniami podanymi na etykietach preparatów oraz zasadami dobrej praktyki rolniczej. W gospodarstwie w Rzeszowie zabiegi wykonywano przy pomocy opryskiwacza Turbine N TNC 1000 (Włochy), z kolei w gospodarstwie w Józefowie nad Wisłą przy pomocy opryskiwacza Agrola 1500 (Polska). Dane dotyczące zastosowanych preparatów oraz terminy zabiegów przedstawiono w tabeli 5.

Zabiegi preparatami chemicznymi wykonano w terminach zgodnych z zaleceniami zawartymi w etykietach: Luna Experience 400 SC – nie później niż 14 dni przed zbiorem, natomiast preparatami Bellis 38 WG i Fontelis 200 SC – nie później niż 21 dni przed zbiorem.

Aplikację preparatem biologicznym wykonywano (zgodnie z etykietą) 6 lub 7 dni po zabiegu preparatem chemicznym.

Zabiegi preparatami chemicznymi przeprowadzano w całych kwaterach (ok. 0,5 ha) danej odmiany, którą później dzielono na dwa bloki: I i II. 6-7 dni po zabiegach preparatami chemicznymi w bloku I aplikowano wodę, w bloku II przeprowadzono zabieg preparatem biologicznym (Rys. 13).

Z każdego bloku pobierano po 4 próbki jabłek: z bloku I próbki kontrolne, natomiast z bloku II próbki badane. Schemat wykonywania zabiegów oraz pobierania próbek przedstawiono na rysunku 13.



Rysunek 13. Schemat pobierania próbek

Tabela 5. Zastosowane preparaty oraz terminy ich aplikacji

Numer doświadczenia	Odmiana jabłoni	Termin zabiegu	Zastosowany preparat	Dawka preparatu	Substancja czynna / mikroorganizmy	Zawartość substancji czynnej / mikroorganizmów	Zastosowanie przed zbiorem [liczba dni]
1.	Gloster	23.09.2016	Bellis 38 WG	0,8 kg/ha	boskalid pyraklostrobina	252 g/kg 128 g/kg	21
		29.09.2016	Zumba Plant®	1 kg/ha	<i>Glomus</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Trichoderma</i> spp.	4% v/v 1×10^9 jtk/g 1×10^3 jtk/g	15
2.	Gala	16.08.2017	Fontelis 200 SC	0,75 l/ha	pentiopirad	200 g/l	21
		23.08.2017	Zumba Plant®	1 kg/ha	<i>Glomus</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Trichoderma</i> spp.	4% v/v 1×10^9 jtk/g 1×10^3 jtk/g	14
3.	Red Jonaprince	23.08.2017	Luna Experience 400 SC	0,75 l/ha	fluopyram tebukonazol	200 g/l 200 g/l	21
		30.08.2017	Zumba Plant®	1 kg/ha	<i>Glomus</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Trichoderma</i> spp.	4% v/v 1×10^9 jtk/g 1×10^3 jtk/g	14
4.	Boskoop	16.08.2018	Bellis 38 WG	0,8 kg/ha	boskalid pyraklostrobina	252 g/kg 128 g/kg	21
		23.08.2018	Zumba Plant®	1 kg/ha	<i>Glomus</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Trichoderma</i> spp.	4% v/v 1×10^9 jtk/g 1×10^3 jtk/g	14
5.	Gala	28.08.2018	Luna Experience 400 SC	0,75 l/ha	fluopyram tebukonazol	200 g/l 200 g/l	21
		04.09.2018	Zumba Plant®	1 kg/ha	<i>Glomus</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Trichoderma</i> spp.	4% v/v 1×10^9 jtk/g 1×10^3 jtk/g	14
6.	Golden Delicious	04.09.2018	Fontelis 200 SC	0,75 l/ha	pentiopirad	200 g/l	21
		11.09.2018	Zumba Plant®	1 kg/ha	<i>Glomus</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Trichoderma</i> spp.	4% v/v 1×10^9 jtk/g 1×10^3 jtk/g	14

3.2.3 Pobieranie próbek

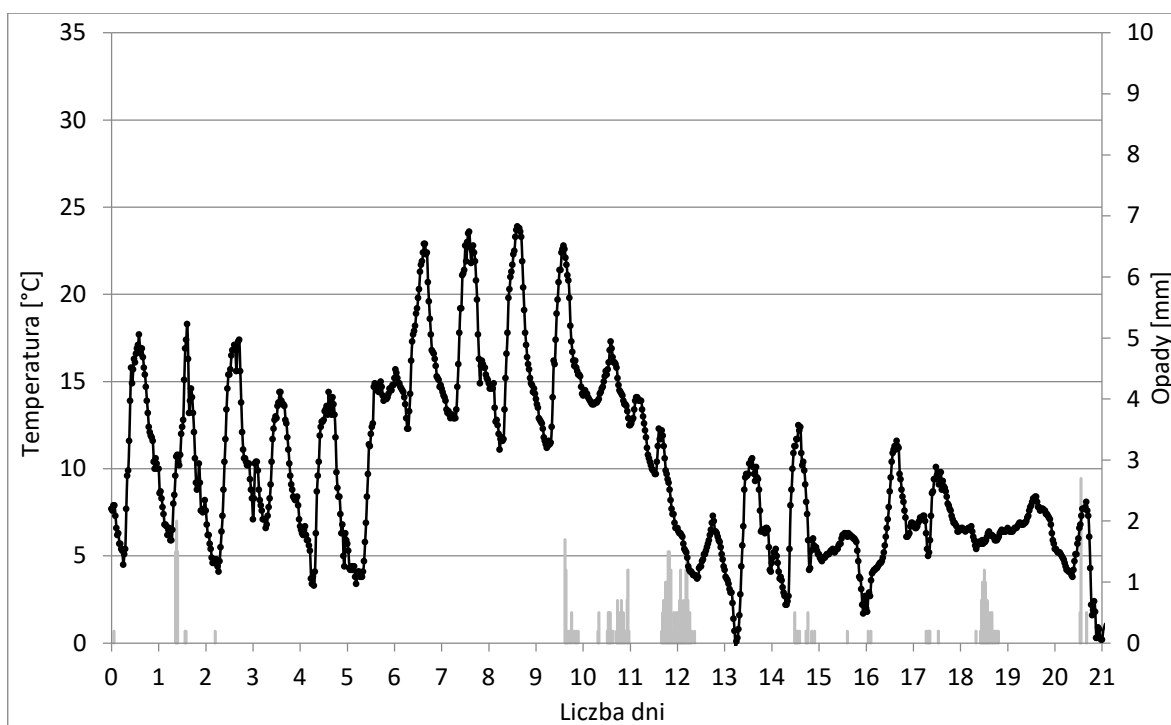
Pierwsze próbki jabłek pobierano ok. 12 godzin po wykonaniu zabiegu preparatem chemicznym, a następnie, co kilka dni przez okres 3 tygodni. Próbki laboratoryjne owoców o masie ok. 1,5 kg (10 jednostek) pobierano ręcznie, z losowo wybranych drzew, po jednym jabłku z drzewa, w czterech powtórzeniach (Rozporządzenie 2007). W pierwszych dwóch terminach poboru, 4 próbki pobierano z całej kwatery, natomiast po wykonaniu zabiegu preparatem biologicznym, próbki pobierano zgodnie ze schematem przedstawionym na rysunku 13. Próbki owoców transportowano do laboratorium w workach z folii polietylenowej, trwale i jednoznacznie oznaczonych. Próbki laboratoryjne rozdrabniano w homogenizatorze (Blixter 4, Robot Coupe, Francja), mieszano w celu zapewnienia reprezentatywności, a następnie wydzielano próbki analityczne o masach 100 g lub 10 g w zależności od zastosowanego w kolejnym etapie sposobu ekstrakcji. Do dnia wykonania ekstrakcji, próbki przechowywano w zamrażarce w temperaturze -17°C w szczelnie zamkniętych workach strunowych.

3.2.4 Warunki pogodowe

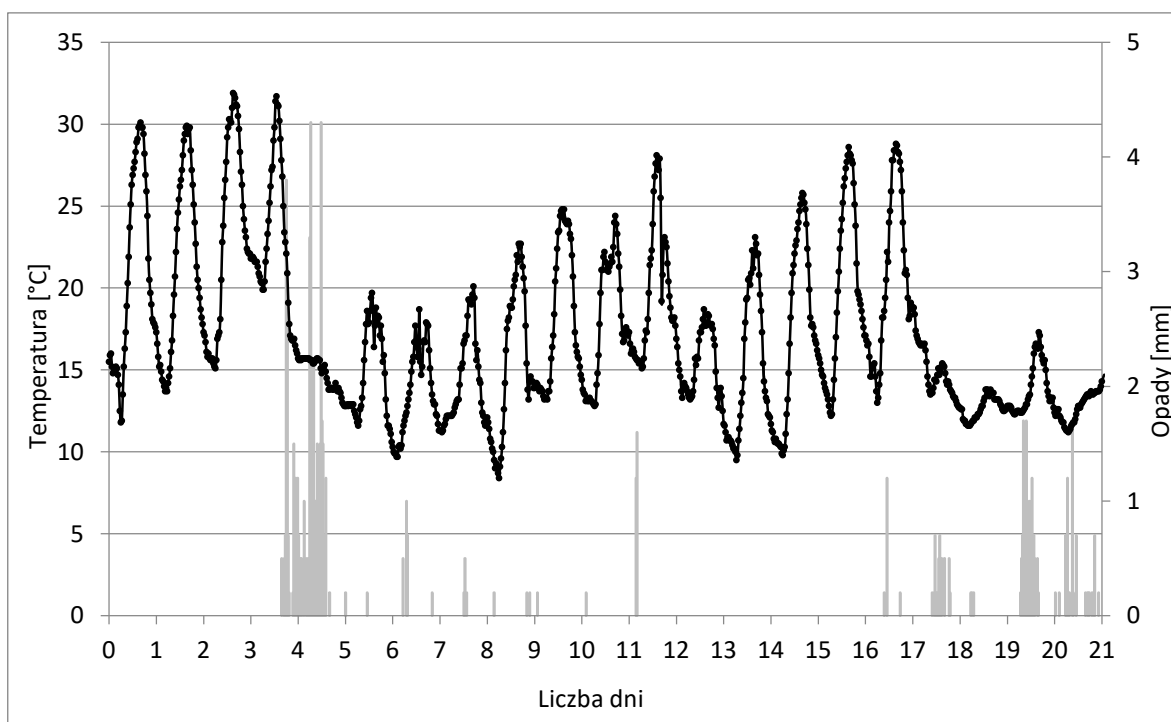
Warunki pogodowe w Józefowie nad Wisłą były monitorowane przez zainstalowaną w sadzie, automatyczną stację pogodową WatchDog 2900ET (Spectrum Technologies Inc., Stany Zjednoczone). Podczas trwania eksperymentów rejestrowano temperaturę ($^{\circ}\text{C}$) i opady deszczu (mm).

Warunki pogodowe w Rzeszowie opisano na podstawie danych dla opadów i temperatury powietrza pobranych ze strony www.weatheronline.pl.

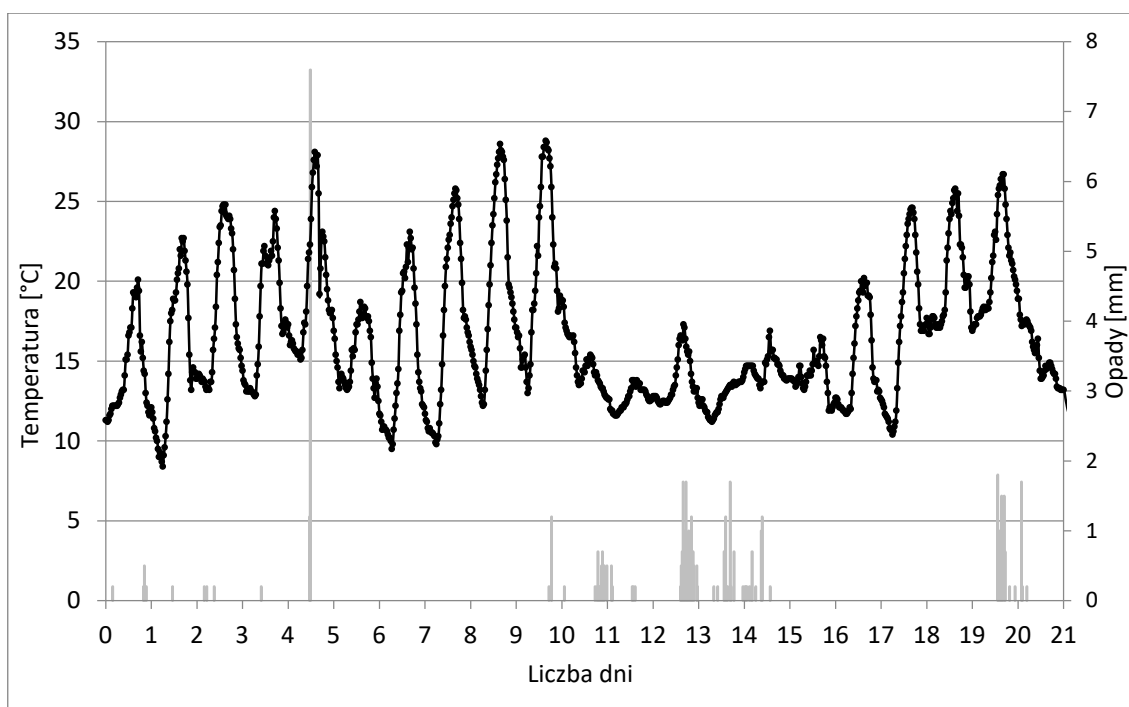
Warunki pogodowe w sadach w Józefowie nad Wisłą i w Rzeszowie przedstawiono na rysunkach 14-19.



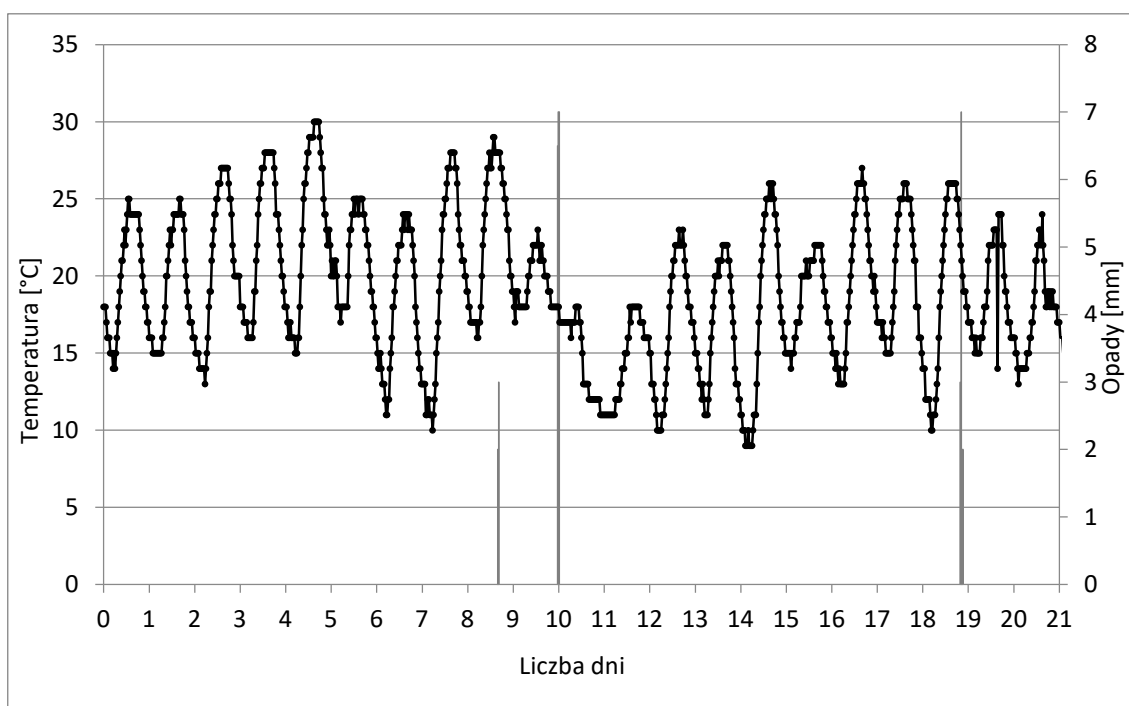
Rysunek 14. Warunki pogodowe w okresie trwania doświadczenia przeprowadzonego na odmianie Gloster w Józefowie nad Wisłą 23.09.2016 – 14.10.2016; zastosowany preparat Bellis 38 WG



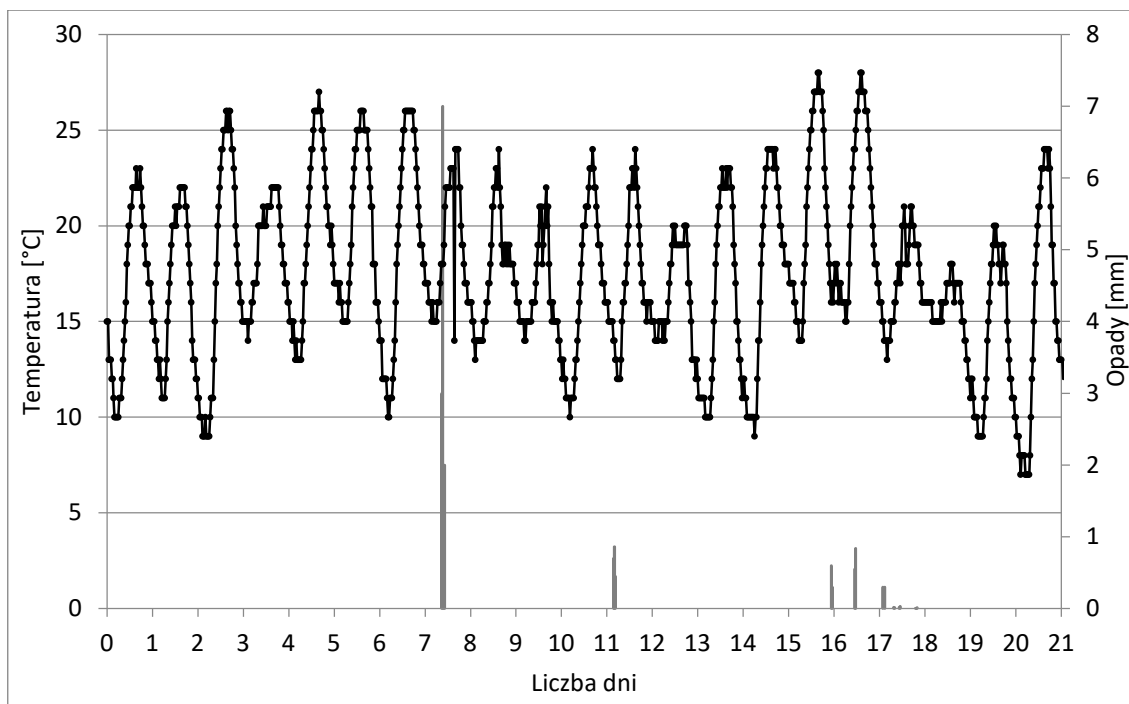
Rysunek 15. Warunki pogodowe w okresie trwania doświadczenia przeprowadzonego na odmianie Gala w Józefowie nad Wisłą 16.08.2017 – 06.09.2017; zastosowany preparat Fontelis 200 SC



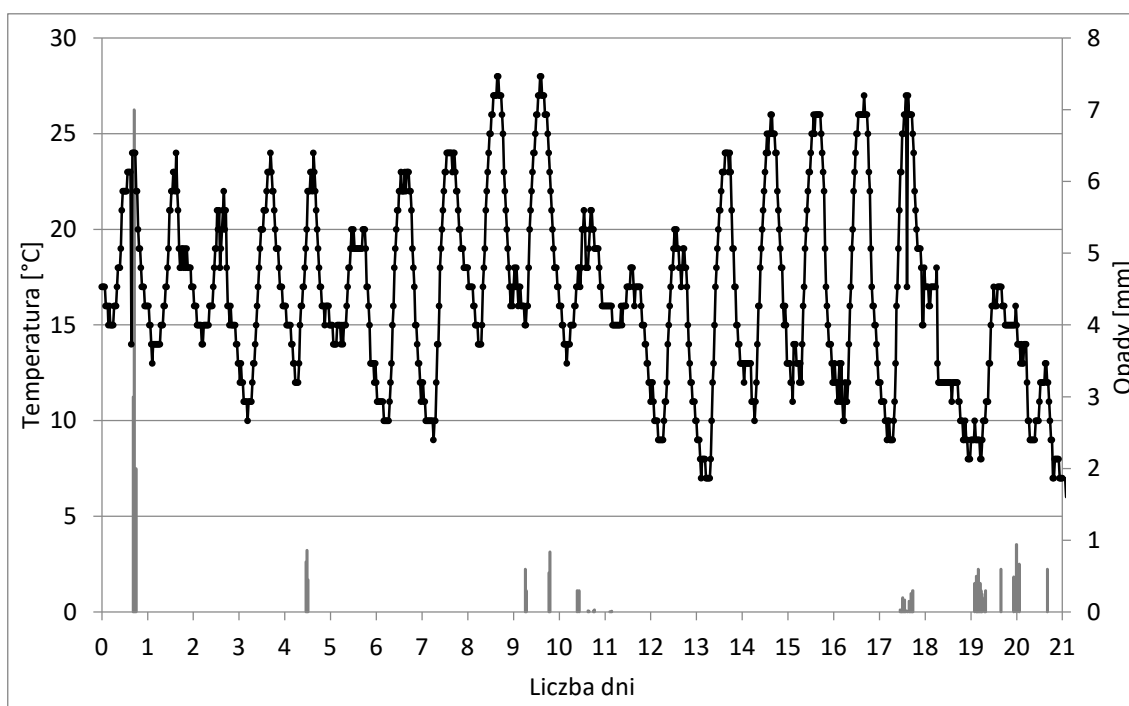
Rysunek 16. Warunki pogodowe w okresie trwania doświadczenia przeprowadzonego na odmianie Red Jonaprince w Józefowie nad Wisłą 23.08.2017 – 13.09.2017; zastosowany preparat Luna Experience 400 SC



Rysunek 17. Warunki pogodowe w okresie trwania doświadczenia przeprowadzonego na odmianie Boskoop w Rzeszowie 16.08.2018 – 06.09.2018; zastosowany preparat Bellis 38 WG



Rysunek 18. Warunki pogodowe w okresie trwania doświadczenia przeprowadzonego na odmianie Gala w Rzeszowie 28.08.2018 – 18.09.2018; zastosowany preparat Luna Experience 400 SC



Rysunek 19. Warunki pogodowe w okresie trwania doświadczenia przeprowadzonego na odmianie Golden Delicious w Rzeszowie 04.09.2018 – 25.09.2018; zastosowany preparat Fontelis 200 SC

3.3 Oznaczanie pozostałości substancji czynnych

3.3.1 Wzorce substancji czynnych

W badaniach wykorzystano certyfikowane materiały odniesienia: boskalid i tebukonazol (Instytut Przemysłu Organicznego, Polska), fluopyram, pyraklostrobina i pentiopirad (Supelco, Stany Zjednoczone). W oznaczeniach pozostałości w jabłkach w 2016 roku wykorzystywano wzorce boskalidu i pyraklostrobiny firmy Dr Ehrenstorfer (Niemcy). Wzorce substancji czynnych były czystości równej lub wyższej 98%. Roztwory podstawowe wzorców o stężeniu ok. 1000 µg/ml przygotowano poprzez odważenie ok. 50 mg certyfikowanego materiału odniesienia i rozpuszczenie go w 50 ml acetonu. Wzorce podstawowe przechowywano w zamrażarce w szczelnie zamkniętych butelkach z ciemnego szkła w temperaturze poniżej -17°C. Roztwory i/lub mieszaniny wzorców roboczych o stężeniach 0,01-1 µg/ml (stosowane w analizach chromatograficznych) otrzymano przez rozcieńczenie wzorców podstawowych ekstraktem „ślepej” próbki. Wzorce robocze przechowywano w lodówce w butelkach z ciemnego szkła w temperaturze ok. 4°C.

3.3.2 Wyposażenie pomiarowe

- Chromatograf gazowy, model 7890 (Agilent Technologies, Stany Zjednoczone) wyposażony w detektory: wychwyty elektronów (µEC) i fosforowo – azotowy (NP) oraz autosampler i kolumnę chromatograficzną HP – 5 MS (polidimetylosiloksan z domieszką 5% fenylo-metylopolisiloksanu) Ultra Inert/ 30 m × 0,25 mm I.D. × 0,32 µm, sterowany za pomocą oprogramowania ChemStation (wersja: B04.03-SP2);
- Chromatograf gazowy, model 7890A (Agilent Technologies, Stany Zjednoczone) wyposażony w detektor mas z potrójnym kwadrupolem (QQQ) model 7000, autosampler oraz kolumnę chromatograficzną HP – 5 MS (polidimetylosiloksan z domieszką 5% fenylo-metylopolisiloksanu) Ultra Inert/ 30 m × 0,25 mm I.D. × 0,25 µm, sterowany za pomocą oprogramowania Mass Hunter (wersja: B.07.06).

3.3.3 Oznaczanie substancji czynnych w podłożach hodowlanych techniką GC – MS/MS – optymalizacja metody

W celu oceny degradacji substancji czynnych fungicydów przez mikroorganizmy, została opracowana metoda ich ekstrakcji z podłoża płynnych. Optymalizacji poddano:

- Rodzaj podłoża;

Do badań z wykorzystaniem bakterii testowanymi podłożami były:

- BTL (Polska), skład: ekstrakt mięsny 2 g/l, ekstrakt drożdżowy 2 g/l, pepton 5 g/l, NaCl 4 g/l, glukoza 10 g/l;
- Bulion 10-krotnie rozcieńczony BTL (Polska);
- Bulion BioCorp (Polska), skład: pepton 5 g/l, ekstrakt wołowy 3 g/l;
- Bulion 10-krotnie rozcieńczony BioCorp (Polska);
- Podłoże mineralne M9 (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone), skład: Na_2HPO_4 33,9 g/l, KH_2PO_4 15 g/l, NH_4Cl 5 g/l, NaCl 2,5 g/l.

Do badań z wykorzystaniem grzybów testowano bulion glukozowo – ziemniaczany (BTL, Polska), skład: ekstrakt ziemniaczany 4,0 g/l, glukoza 20,0 g/l.

- Sposób ekstrakcji:

- ekstrakcja ciecz – ciecz;
- Quechers;

- Użyte odczynniki:

- acetonitryl;
- dichlorometan;
- aceton;
- odczynnik Carezza I – uwodniony octan cynku $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO}) \times 2\text{H}_2\text{O}$ (18%) i odczynnik Carezza II – uwodniony heksacyjanożelazian (II) potasu $[\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (10 %);
- 2,5% roztwór siarczanu(VI) sodu.

Przed rozpoczęciem badań, opracowana metoda została zwalidowana w zakresie: liniowości, poprawności, precyzji i granicy oznaczalności.

Odczynniki

- Aceton ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$), czystość GC lub HPLC (Honeywell, Stany Zjednoczone);
- Eter naftowy (frakcja węglowodorów wrzących w temperaturze 40-60°C), czystość GC (Chempur, Polska);
- Siarczan(VI) sodu (Na_2SO_4) bezwodny, czystość cz.d.a (Chempur, Polska);
- Wzorzec wewnętrzny – fosforan(V) trifenylu (TPP, ang. *Triphenyl Phosphate*), czystość 99,9% (Supelco, Stany Zjednoczone).

Sprzęt i materiały pomocnicze

- Wirówka, model MPW – 350R (MPW MED. INSTRUMENTS, Polska);
- Wytrząsarka, model BenchMixer BV 1000 (Benchmark Scientific, Stany Zjednoczone);

- Pipety automatyczne o poj. 0,1-1 ml;
- Probówki polipropylenowe o poj. 15 ml.

Opis zoptymalizowanej metody

100 µl próbki podłoża płynnego (bulion odżywczy 10-krotnie rozcieńczony lub bulion glukozowo – ziemniaczany) pobierano do probówek polipropylenowych, dodawano 5 ml acetonu oraz ok. 0,5 g bezwodnego siarczanu(VI) sodu. Zawartość probówek wytrząsano przez 1 min, a następnie wirowano 3500 obr/min przez 5 min. Pobierano 200 µl acetonowego ekstraktu do fiołki chromatograficznej, uzupełniano 800 µl eteru naftowego (w 1 ml ekstraktu znajdowało się 0,004 mg próbki) oraz dodawano 100 µl wzorca wewnętrznego TPP. Ekstrakty poddawano analizie techniką chromatografii gazowej z detekcją mas. Warunki pracy chromatografu z detektorem mas przedstawiono w tabeli 6, a przejścia monitorowanych reakcji wielokrotnych (MRM, ang. *Multiple Reaction Monitoring*) w tabeli 7.

Tabela 6. Warunki pracy chromatografu gazowego z detektorem mas (tryb MRM) w oznaczaniu substancji czynnych

Sposób nastrzyku/ objętość/ temperatura dozownika	bez podziału strumienia/ 1µL/ 250°C
Kolumna	HP-5 MS Ultra Inert/ 30 m × 0,25 mm I.D. × 0,25 µm
Gaz nośny	hel (czystość 5,0)
Typ jonizacji	elektronowa (napięcie 70 eV)
Temp. linii transferowej	250°C
Temp. źródła jonów	230°C
Temp. kwadrupoli	150°C
Piec	40°C (utrzymywane przez 2 min) wzrost temp. 30°C/min → 220°C, wzrost temp. 5°C/min → 260°C, wzrost temp. 20°C/min → 280°C (utrzymywane przez 8 min) czas analizy 25 min
Gazy kolizyjne	hel i azot
Oprogramowanie	Mass Hunter, wersja B.07.06

Tabela 7. Przejścia MRM dla badanych substancji czynnych i wzorca wewnętrznego

Substancja czynna	Jon macierzysty [m/z]	Jon fragmentacyjny [m/z]	Energia celi kolizyjnej [eV]
Fluopyram Q	173,0	145,1	5
Fluopyram I	396,1	223,0	10
Tebukonazol Q	250,1	125,0	20
Tebukonazol I	250,1	70,1	10
Boskalid Q	139,9	112,0	10
Boskalid I	112,0	76,3	15
Pyraklostrobina Q	132,0	77,1	20
Pyraklostrobina I	132,0	104,0	15
Pentiopirad Q	302,1	151,9	15
Pentiopirad I	302,1	177,0	15
Fosforan(V) trifenyłu (TPP) Q	326,1	128,0	15
Fosforan(V) trifenyłu (TPP) I	326,1	228,4	15

Q – przejścia w analizie jakościowej, I – przejścia w analizie ilościowej

3.3.4 Oznaczanie substancji czynnych w jabłkach

Pozostałości substancji czynnych fungicydów w jabłkach oznaczano w oparciu o dwie metody. Do analizy próbek jabłek pobranych w 2016 roku wykorzystano metodę polegającą na ekstrakcji analitów z matrycy stałej (LSE, ang. *Liquid Solid Extraction*). Pozostałości substancji czynnych w ekstraktach oznaczano techniką chromatografii gazowej z detekcją wychwytu elektronów (μ EC) i azotowo – fosforową (NP). Natomiast ekstrakty z próbek jabłek pobranych w 2017 i 2018 roku przygotowano metodą Quechers, a pozostałości oznaczano techniką chromatografii gazowej z wykorzystaniem spektrometrii mas.

Przed rozpoczęciem badań, obie metody zostały zwalidowane w zakresie: liniowości, poprawności, precyzji i granicy oznaczalności.

3.3.4.1 Ekstrakcja analitów metodą LSE i oznaczanie techniką GC – μ ECD/NPD

Odczynniki

- Aceton (C_3H_6O), czystość GC lub HPLC (Honeywell, Stany Zjednoczone);
- Dichlorometan (CH_2Cl_2), czystość GC (Honeywell, Stany Zjednoczone);
- Eter naftowy (frakcja węglowodorów wrzących w temperaturze 40-60°C), czystość GC (Chempur, Polska);
- Eter dietylowy ($C_4H_{10}O$), czystość cz.d.a (Chempur, Polska);
- Woda destylowana (z systemu oczyszczania wody SolPure XiO P, Elkar, Polska);

- Siarczan(VI) sodu (Na_2SO_4) bezwodny, czystość cz.d.a (Chempur, Polska);
- Florisil (MgO_3Si) adsorbent do chromatografii kolumnowej 60-100 mesh (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone).

Sprzęt i materiały pomocnicze

- Homogenizator, model Blixter 4 (Robot Coupe, Francja);
- Homogenizator, model 8010 EG (Waring Commercial, Stany Zjednoczone);
- Wyparka obrotowa, model Laborta 4000 (Heidolph, Niemcy);
- Waga analityczna, model WPS 510/C/2 (Radwag, Polska);
- Zestaw do sączenia pod próżnią: lejek Büchnera, kolba filtracyjna o poj. 500 ml, pompka wodna;
- Szkło miarowe: pipety jedno – i wielomiarowe o poj. 1-25 ml (kl. A), kolby miarowe o poj.: 10, 25, 50, 100 ml (kl. A), cylindry miarowe o poj. 100 i 250 ml;
- Sączki filtracyjne \varnothing 10 i 15 cm;
- Kolby Erlenmeyera o poj. 250 ml, rozdzielacze o poj. 500 ml;
- Pipety Pasteura;
- Kolumna chromatograficzna szklana 20 mm x 40 cm z kranem teflonowym;
- Wata bawełniana – wiskozowa.

Porcję analityczną jabłek o masie 100 g rozmrażano, a następnie homogenizowano przez ok. 1 min w homogenizatorze ze 150 ml acetonu, przesączono pod próżnią przez sączek filtracyjny umieszczony w lejku Büchnera. Blender przepłukano 50 ml acetonu i popłuczyny zastosowano do przemycia sączka. Przesącz jak i popłuczyny zbierano do z kolby filtracyjnej. Po odsączeniu zawartość kolby dokładnie wymieszano i pobrano 1/5 otrzymanego przesączu (co odpowiadało 20 g próbki analitycznej), a następnie przesącz umieszczono w rozdzielaczu zawierającym 100 ml 2,5% siarczanu(VI) sodu i 20 ml dichlorometanu. Pozostałości pestycydów ekstrahowano trzykrotnie dichlorometanem (20 ml, 10 ml, 10 ml). Fazę organiczną sączono do kolby Erlenmeyera przez warstwę bezwodnego siarczanu(VI) sodu umieszczonego na sączku w lejku szklanym. Połączone ekstrakty odparowano do sucha w temperaturze $\leq 40^\circ\text{C}$ stosując wyparkę obrotową. Pozostałości przenoszono ilościowo za pomocą pipet Pasteura eterem naftowym do 10 ml kolby jednomiarowej. Otrzymany ekstrakt oczyszczono za pomocą chromatografii adsorpcyjnej. Na dnie kolumny chromatograficznej umieszczono zwitek waty o średnicy ok. 1 cm a następnie odważono 1,1 g florisilu i 4,5 g bezwodnego siarczanu(VI) sodu. Na kolumnę наносzono 5 ml ekstraktu. Pestycydy eluowano 70 ml mieszaniny eteru dietylowego i eteru naftowego 3:7 (v/v), a następnie 70 ml mieszaniny eteru naftowego i acetonu 7:3 (v/v). Obie

frakcje zbierano do kolby Erlenmeyera, odparowano na wyparce obrotowej w temperaturze $\leq 40^{\circ}\text{C}$. Pozostałości rozpuszczono w eterze naftowym i przenoszono ilościowo za pomocą pipety Pasteura do 10 ml kolby jednomiarowej.

W tak przygotowanych ekstraktach oznaczano pozostałości substancji czynnych pestycydów. Oznaczenia przeprowadzano za pomocą chromatografu gazowego z detektorami μEC i NP. Warunki pracy chromatografu przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Warunki pracy chromatografu gazowego z detektorami μEC i NP

Sposób nastrzyku/ objętość/ temperatura dozownika	bez podziału strumienia / $2\mu\text{l}$ / 250°C
Kolumna	HP – 5 MS Ultra Inert / $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm I.D.} \times 0,32\text{ }\mu\text{m}$
Gaz nośny	azot (czystość 5,0) / $3,0\text{ ml / min}$, 18,7 psi
Piec	100°C (0 min) $\rightarrow 10^{\circ}\text{C/min} \rightarrow 180^{\circ}\text{C}$ (utrzymywane przez 4 min) $\rightarrow 3^{\circ}\text{C/min} \rightarrow 220^{\circ}\text{C}$ (utrzymywane przez 15 min) $\rightarrow 10^{\circ}\text{C/min} \rightarrow 260^{\circ}\text{C}$ (utrzymywane przez 11 min). Czas analizy 55,3 min
Detektor μEC/ gaz pomocniczy	280°C / azot (czystość 5,0) 30 ml/min
Detektor NP/ gazy	300°C / wodór (czystość 5,0) $3,0\text{ ml/min}$, powietrze sprężone 60 ml/min / azot (czystość 5,0) 10 ml/min
Oprogramowanie	ChemStation, Rev. B04.03-SP2

Opisaną powyżej metodę zastosowano do oznaczania pozostałości boskalidu i pyraklostrobiny w roku 2016. Wyniki ilościowe dla obu substancji czynnych odczytano ze wskazań detektora μEC , a potwierdzenie uzyskano z detektora NP.

3.3.4.2 Ekstrakcja analitów metodą Quechers i oznaczanie techniką GC – MS/MS

Do przygotowania ekstraktów, z próbek pobranych w latach 2017–2018, zastosowano wielopozostałościową metodę oznaczania pestycydów QuEChERS zgodnie z normą europejską PN-EN 15662:2008 (PN-EN 15662:2008, obecnie zastąpioną przez PN-EN 15662:2018-06). W metodzie tej, przygotowanie próbki do analizy instrumentalnej składa się z kilku etapów: homogenizacja, ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi, wysalanie, oczyszczanie ekstraktu za pomocą dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej (dSPE). Analiza pestycydów przeprowadzana jest za pomocą technik łączonych GC – MS/MS lub LC – MS/MS. Metoda ta charakteryzuje się niewielkim zużyciem odczynników organicznych.

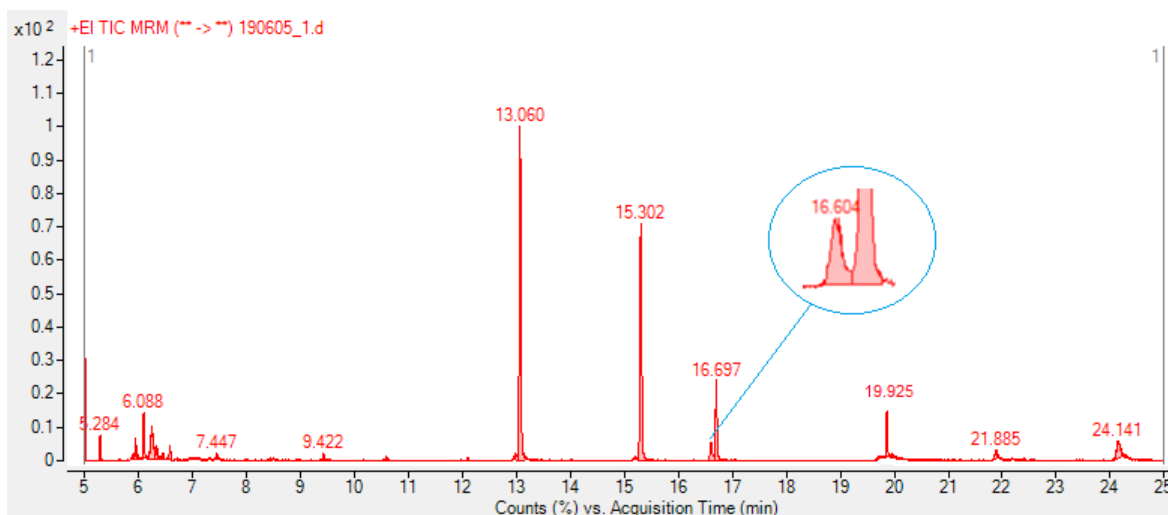
Odczynniki

- Acetonitryl (ACN), czystość HPLC (Honeywell, Stany Zjednoczone);
- Eter naftowy (frakcja węglowodorów wrząca w temperaturze 40-60°C), czystość GC (Chempur, Polska);
- Sole buforujące zawierające:
 - 4 g bezwodnego siarczanu(VI) magnezu (MgSO_4), czystość cz.d.a (Chempur, Polska);
 - 1 g chlorku sodu (NaCl), czystość cz.d.a (Honeywell, Stany Zjednoczone);
 - 0,5 g półtorawodnego wodorocytrynianu sodu ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$), czystość cz.d.a (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone);
 - 1 g dwuwodnego cytrynianu sodu ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), czystość cz.d.a (Chempur, Polska);
- Mieszanina soli i sorbentów do dyspersyjnego oczyszczania SPE ekstraktów zawierająca:
 - 0,15 g aminy pierwszo- i drugorzędową (PSA, ang. *Primary Secondary Amine*), rozmiar cząstek – 50 μm , rozmiar porów – 70 Å, powierzchnia czynna – 500 m^2/g (Supelco, Stany Zjednoczone);
 - 0,9 g siarczanu(VI) magnezu (MgSO_4), czystość cz.d.a (Chempur, Polska);
- Wzorzec wewnętrzny – TPP, czystość 99,9% (Supelco, Stany Zjednoczone).

Sprzęt i materiały pomocnicze

- Wirówka, model MPW-350R (MPW MED. INSTRUMENTS, Polska);
- Wytrząsarka, BenchMixer BV 1000 (Benchmark Scientific, Stany Zjednoczone);
- Probówki polipropylenowe o poj. 15 i 50 ml.

Próbkę analityczną o masie 10 g umieszczono w probówce polipropylenowej o poj. 50 ml, dodano 10 ml acetonitrylu i wytrząsano energicznie 1 min. Dodano sole buforujące i ponownie wytrząsano energicznie przez 1 min. Zawartość próbówki odwirowywano przez 5 min przy obrotach wirówki 3500 obr/min. 5 ml warstwy organicznej przeniesiono do próbówki propylenowej o poj. 15 ml zawierającej mieszaninę soli i sorbentów do dyspersyjnego oczyszczania ekstraktów. Zawartość próbówki wytrząsano przez 1 min i odwirowywano przez 5 min przy 3500 obr/min. 750 μl oczyszczonego ekstraktu odparowywano w strumieniu azotu do sucha, a następnie suchą pozostałość rozpuszczano w 750 μl eteru naftowego i dodawano 100 μl wzorca wewnętrznego TPP o stężeniu 21,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ekstrakty poddawano analizie techniką chromatografii gazowej z detekcją mas. Warunki pracy chromatografu przedstawiono w tabeli 6, a przejścia MRM w tabeli 7 (p. 3.3.3). Na rysunku 20 przedstawiono chromatogram mieszaniny wzorców w matrycy jabłka.



Rysunek 20. Chromatogram badanych substancji czynnych: $t_R = 13,060$ – fluopyram; $t_R = 15,302$ – pentiopirad; $t_R = 16,604$ – tebukonazol; $t_R = 16,697$ – wzorzec wewnętrzny; $t_R = 19,925$ – pyraklostrobina; $t_R = 21,885$ – boskalid; stężenie substancji czynnych: $1 \mu\text{g/ml}$, stężenie wzorca wewnętrznego $2,16 \mu\text{g/ml}$; matryca jabłko; t_R – czas retencji

3.3.5 Analiza jakościowa i ilościowa

Chromatograficzną analizę jakościową przeprowadzano przez porównanie czasów retencji wzorców z czasami retencji substancji oznaczanych oraz widm MRM w przypadku analiz techniką GC – MS/MS. Analizę ilościową przeprowadzono przez porównanie wysokości pików oznaczanego składnika z wysokością pików odpowiadającą znanej ilości substancji wzorcowej. Pozostałości pestycydów (P) obliczano według równania:

$$P = \frac{C \times V}{m}$$

gdzie:

C – stężenie w ekstrakcie końcowym odczytane z oprogramowania ChemStation lub Mass Hunter [$\mu\text{g/ml}$];

V – objętość końcowa ekstraktu [ml];

m – masa próbki w ekstrakcie [g].

3.3.6 Walidacja metody

Walidację metod przeprowadzono zgodnie z wymaganiami Komisji Europejskiej zawartymi w dokumentach: SANTE/11945/2015 i SANTE/11813/2017 (SANTE 2015, SANTE 2017).

Parametry walidacyjne: liniowość, precyzję, poprawność, granicę oznaczalności określano w oparciu o krzywe kalibracyjne wyznaczone dla substancji czynnych oraz pomiary próbek wzbogaconych.

- Liniowość określano przez wyznaczenie współczynnika korelacji (R). Wyznaczano ją jako zależność wysokości pików w funkcji stężenia dla 5 poziomów stężeń związków obejmujących zakres 0,01-1 µg/ml.
- Poprawność metody oceniano przez analizę próbek „ślepych” wzbogaconych dodatkiem roztworów wzorcowych badanych substancji czynnych na dwóch poziomach stężeń: 0,01 i 1 µg/ml (dla jabłek) oraz na poziomach: 1 i 100 µg/ml (podłoża płynne – badania laboratoryjne).

Wartości odzysków poszczególnych próbek oraz średni odzysk obliczano z następujących wzorów:

- Odzysk (R):

$$R = \frac{C_1}{C_2} \times 100 [\%]$$

gdzie:

C_1 – stężenie analitu w ekstrakcie [µg/ml];

C_2 – stężenie dodanego analitu [µg/ml];

- Średni odzysk ($R_{\text{śr}}$):

$$R_{\text{śr}} = \sum_{i=1}^n \frac{R_i}{n} [\%]$$

gdzie:

R_i – odzysk;

n – liczba próbek.

- Precyzję (powtarzalność) metody wyznaczono podczas badania odzysku metody i wyrażono ją w postaci odchylenia standardowego (SD) oraz względnego odchylenia standardowego (RSD).

- Odchylenie standardowe (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (R_i - R_{\text{śr}})^2}{n - 1}} [\%]$$

gdzie:

R_i – kolejny odzysk;

$R_{\text{śr}}$ – średni odzysk;

n – liczba próbek.

- Względne odchylenie standardowe (RSD):

$$RSD = \frac{SD}{R_{\text{śr}}} \times 100 [\%]$$

gdzie:

SD – odchylenie standardowe;

$R_{\text{śr}}$ – średni odzysk.

Za kryterium akceptacji metody przyjęto: średnie odzyski dla badanych substancji czynnych w zakresie 70-120%, precyzję wyrażoną jako $RSD \leq 20\%$ oraz liniowość odpowiedzi detektora określoną współczynnikiem korelacji $R \geq 0,99$.

3.4 Wyznaczanie kinetyki zanikania substancji czynnych

Zależność pomiędzy pozostałościami substancji czynnych, a czasem jaki upłynął od aplikacji preparatu chemicznego opisano równaniem kinetycznym dla reakcji pierwszego rzędu:

$$P_t = P_0 \times e^{-kt}$$

gdzie:

P_t – pozostałość substancji czynnej po czasie t [mg/kg];

P_0 – początkowa pozostałość substancji czynnej w czasie $t = 0$ [mg/kg];

t – czas [liczba dni po zabiegu];

k – stała szybkości zanikania.

Dla badanych substancji czynnych wyznaczono czas połowicznego zanikania ($t_{1/2}$) na podstawie równania:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k$$

3.5 Oznaczanie mikotoksyn w próbkach jabłek

Zastosowany w doświadczeniach preparat biologiczny zawiera grzyby, które mogą produkować szereg metabolitów, w tym mikotoksyny. W związku z powyższym w każdym z przeprowadzanych doświadczeń polowych w ostatnim dniu pobierania próbek, czyli tuż przed złożeniem owoców do chłodni, pobrano próbki jabłek w celu oznaczania mikotoksyn. Probki pobierano z rzędów, w których aplikowano preparat biologiczny.

Oznaczanie mikotoksyn przeprowadzono w Laboratorium Badawczym Mikotoksyn Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy.

Odczynniki

- Acetonitryl, czystość HPLC;
- Metanol, czystość HPLC;
- Woda, czystość HPLC;
- Wzorce wewnętrzne: patulina izotopowo znakowany ^{13}C (13C-PAT; $c = 50 \text{ pg/l}$), trichoteceny i zearalenon izotopowo znakowane ^{13}C (13C-DON $c = 2500 \text{ }\mu\text{g/l}$, 13C-T2 $c = 250 \text{ }\mu\text{g/l}$, 13C-HT2 $c = 250 \text{ }\mu\text{g/l}$, 13C-ZAN $c = 1000 \text{ }\mu\text{g/l}$).

Sprzęt i materiały pomocnicze

- Chromatograf ciekłowy Nexera (Shimadzu, Japonia) z detektorami: pułapka jonowa 5500 QTrap (Sciex, Stany Zjednoczone) i mas API 4000 (Sciex, Stany Zjednoczone). Anality rozdzielono na kolumnach chromatograficznych Gemini C18 $150 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \text{ }\mu\text{m}$ (Phenomenex, Stany Zjednoczone) (patulina) i Gemini-NX-C18 $150 \times 4,6 \text{ mm}$, $3 \text{ }\mu\text{m}$ (Phenomenex, Stany Zjednoczone) (trichoteceny i zearalenon);
- Wirówka;
- Kolumna SPE MycoSep 228 AflaPat (Romer, Stany Zjednoczone);
- Kolumna Bond Elut® Mycotoxin (Agilent, Stany Zjednoczone);
- Filtr strzykawkowy PTFE $0,22 \text{ }\mu\text{m}$.

3.5.1 Patulina

Pięć gramów zhomogenizowanej próbki jabłka wytrząsano z 20 ml mieszaniny acetonitryl: woda 80:20 (v/v) przez 60 min, a następnie odwirowano przy 5000 obr/min przez 10 min. 8 ml supernatantu oczyszczono na kolumnie SPE. Do 4 ml oczyszczonego eluatu dodano 20 μl wzorca wewnętrznego patuliny izotopowo znakowanej 13C-PAT i przeniesiono do stożkowej fiolki. Zawartość odparowano do sucha pod delikatnym strumieniem azotu w temperaturze 45°C . Pozostałość rozpuszczono w 1 ml mieszaniny fazy ruchomej metanol: woda 3:7 (v/v), a następnie przesączono przez filtr strzykawkowy PTFE $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. Oznaczenie patuliny przeprowadzono z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii ciekłowej z detektorem typu pułapka jonowa. Warunki pracy chromatografu przedstawiono w tabeli 9. Warunki pracy spektrometru mas oraz przejścia MRM dla patuliny i wzorca wewnętrznego przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 9. Warunki pracy chromatografu cieczowego z detektorem mas typu pułapka jonowa (tryb MRM) w oznaczaniu patuliny

Szybkość przepływu	1 ml/min
Objętość nastrzyku	5 µL
Fazy ruchome: A B	metanol / woda / kwas octowy 10/89/1, (v/v/v) metanol / woda / kwas octowy 97/2/1, (v/v/v) (obie fazy zawierały 5 mmol/l octanu amonu)
Gradient przepływu	0% B do 2 min 50% B od 2 do 5 min 100% B do 7 min 0% B do 12 min
Ciśnienie gazu nośnego	30 psi
Napięcie/temperatura jonizacji	-4500 V / 550°C

Tabela 10. Przejścia MRM dla patuliny i wzorca wewnętrznego oraz warunki pracy spektrometru mas

Oznaczana substancja	Jonizacja	Jon macierzysty [m/z]	Jon fragmentacyjny [m/z]	Potencjał deklasteringu [V]	Energia kolizji [V]	Potencjał na wyjściu z celi [V]
Patulina	[M-H] ⁻	153,0	109,1/81,0	-85	-12/-16	-7/-9
13C patulina	[M-H] ⁻	160,0	115,0/86,1	-95	12/-16	-13/-13

3.5.2 Trichoteceny i zearalenon

12,5 g zhomogenizowanej próbki jabłka wytrząsano z 50 ml mieszaniny acetonitryl: woda 80:20 (v/v) przez 60 min, ekstrakt odwirowano przy 5000 obr/min przez 10 min. Do 4 ml ekstraktu dodano 40 µl roztworu wzorca wewnętrznego (13C-ZAN) i mieszaninę naniesiono na kolumnę Bond Elut® Mycotoxin (Agilent, Stany Zjednoczone). Następnie do 2 ml oczyszczonego ekstraktu dodano po 50 µL roztworu wzorców wewnętrznych (13C-DON, 13C-T2 i 13C-HT2) i mieszaninę odparowano w strumieniu azotu w temperaturze 45°C. Pozostałości rozpuszczono w 495 µL mieszaniny fazy ruchomej MeOH:H₂O (1:4). Trichoteceny i zearalenon oznaczono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją mas MS/MS (detektor typu potrójny kwadrupol). Warunki pracy chromatografu przedstawiono w tabeli 11. Warunki pracy spektrometru mas oraz przejścia MRM w oznaczaniu trichotecenów, zearalenonu i wzorca wewnętrznego przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 11. Warunki pracy chromatografu cieczowego z detektorem mas (tryb MRM) w oznaczaniu trichotecenów i zearalenonu

Szybkość przepływu	0,5 ml/min
Objętość nastrzyku	7 μ L
Fazy ruchome: A B	1% CH ₃ COOH w H ₂ O metanol (obie fazy zawierały 5 mmol/l octanu amonu)
Gradient przepływu	30% B do 0,5 min 90% B od 0,5 do 6 min 90% B do 10 min 30% B do 15 min
Ciśnienie gazu nośnego	25 psi
Napięcie/temperatura	Negatywne -4000 V/pozytywne 5000 V/500°C

Tabela 12. Przejścia MRM dla trichotecenów, zearalenonu i wzorców wewnętrznych oraz warunki pracy spektrometru mas

Oznaczana substancja	Jonizacja	Jon macierzysty [m/z]	Jon fragmentacyjny [m/z]	Potencjał deklasteringu [V]	Energia kolizji [V]	Potencjał na wyjściu z celi [V]
Deoksyniwalenol	[M+Ac] ⁻	355,1	264,8/58,9	-35	-20/-38	-17/-1
13C Deoksyniwalenol	[M+Ac] ⁻	370,2	310,0	-50	-14	-7
Diacetoksycirpenol	[M+Ac] ⁻	384,1	307,0/247,0	51	17/19	20/16
HT-2 toksyna	[M+NH ₄] ⁺	442,2	215,0/263,0	51	19/17	14/18
13C HT-2 toksyna	[M+NH ₄] ⁺	464,1	278,1	51	17	18
T-2 toksyna	[M+NH ₄] ⁺	484,1	215,0/185,0	61	25/29	14/12
13C T-2 toksyna	[M+NH ₄] ⁺	508,3	322,1	61	19	8
Niwalenol	[M+Ac] ⁻	371,1	281,0/59,0	-40	-22/-40	-14/-5
Zearalenon	[M-H] ⁻	317,1	130,8/174,9	-85	-40/-32	-7/-9
13 C zearalenon	[M-H] ⁻	335,1	139,9	-100	-42	-7

3.6 Analiza statystyczna

Średnie wartości \pm SD obliczono na podstawie co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczną oceniono za pomocą programu Microsoft Office Excel, stosując test t Studenta dla prób niezależnych z rozkładem dwuśladowym.

Na wykresach różnice istotne statystycznie oznaczono jako: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4. WYNIKI BADAŃ

4.1 Oznaczanie pozostałości substancji czynnych

Optymalizacji poddano metodę ekstrakcji substancji czynnych z podłoży hodowlanych. Walidację metod analitycznych przeprowadzono z wykorzystaniem podłoży hodowlanych: 10-krotnie rozcieńczonego bulionu odżywczego i bulionu glukozowo – ziemniaczanego (badania laboratoryjne) oraz owoców jabłek (badania polowe). Wyznaczono takie parametry metod jak: liniowość, granicę oznaczalności, poprawność i precyzję.

4.1.1 Oznaczanie substancji czynnych w podłożach hodowlanych – optymalizacja i walidacja metody

W celu oznaczenia degradacji substancji czynnych fungicydów, opracowano metodę ekstrakcji z podłoży hodowlanych. Optymalizacji poddano:

- rodzaj podłoża;
- sposób ekstrakcji;
- stosowane rozpuszczalniki.

Pierwszy etap badań dotyczył wyboru rodzaju podłoża, w którym będą przeprowadzone badania. Podłoże musiało łatwo ulegać rozdziałowi w czasie ekstrakcji i jednocześnie zawierać taką ilość składników odżywczych, aby zapewnić przeżywalność testowanych bakterii i grzybów. Ponadto, musiały zostać spełnione założone parametry walidacyjne: odzysk substancji czynnych w zakresie 70-120%. Podłoża wzbogacano wzorcami substancji czynnych na poziomie 1 µg/ml.

W przypadku wyboru podłoża hodowlanego dla bakterii *B. subtilis* testowano bulion odżywczy sporządzony według etykiety, jednak wysoka zawartość białka i tłuszczu utrudniała prawidłowy rozdział w czasie ekstrakcji. Dla bulionu odżywczego testowano sposób ekstrakcji oraz dobór odczynników. Sprawdzono efektywność ekstrakcji w układzie ciecz – ciecz oraz Quechers. Ekstrahowano badane substancje czynne przy użyciu: acetonitrylu, acetonu, dichlorometanu i siarczanu(VI) sodu (Tab. 13). Dla wszystkich sprawdzonych modyfikacji nie uzyskano rozdziału faz organicznej i nieorganicznej. Jedną z metod stosowaną do odbiałczania i klarowania roztworów (usuwania związków wielkocząsteczkowych: białek, garbników, pektyn) jest metoda Carreza. Dla pozbycia się substancji przeszkadzających bulion klarowano odczynnikami Carreza I i II. Jednak w czasie ekstrakcji dichlorometanem nie uzyskano rozdziału faz.

Drugim podłożem jakie testowano było podłoże minerale (M9). Z przeprowadzonej ekstrakcji podłoża wzbogaconego badanymi substancjami czynnymi otrzymano zadowalający wynik dla odzysku, jednak po 24 godzinnej hodowli bakterie *B. subtilis* nie przeżywały. Z tego powodu w dalszym etapie zdecydowano się na 10-krotne rozcieńczenie bulionu odżywczego. Umożliwiło to ekstrakcję substancji czynnych z matrycy z zadowalającym wynikiem odzysku, a jednocześnie zapewniło przeżywalność bakterii. Testowano jednocześnie podłoża z dwóch firm: BTL i BioCorp. W badaniach walidacyjnych lepszy odzysk (74%-103%) uzyskano dla bulionu firmy BTL, który wykorzystywano w dalszych badaniach.

W przypadku wyboru podłoża hodowlanego dla grzybów testowano bulion glukozowo – ziemniaczany. Podczas ekstrakcji uzyskano rozdział faz oraz odzyski w granicach 83%-97%. W podłożu tym obserwowano również wzrost grzybów.

Ekstrakcję substancji czynnych fungicydów z podłoży z wykorzystaniem dichlorometanu, acetonu i 10 ml 2,5% siarczanu(VI) sodu przeprowadzano w rozdzielaczach o poj. 25 ml, natomiast ekstrakcję z wykorzystaniem acetonu i bezwodnego siarczanu(VI) sodu przeprowadzono w 15 ml probówkach polipropylenowych.

Tabela 13. Dobór parametrów ekstrakcji z podłoża płynnych (kolorem zielonym oznaczono optymalny sposób ekstrakcji); poziom wzbogacenia 1 µg/ml

Lp.	Rodzaj podłoża	Sposób ekstrakcji	Rozpuszczalnik	Odzysk [%]	Uwagi
1.	bulion odżywczy nierozcieńczony BTL	ciecz – ciecz	5 ml dichlorometanu	–	brak rozdziału faz
2.	bulion odżywczy nierozcieńczony BioCorp	ciecz – ciecz	5 ml dichlorometanu	–	brak rozdziału faz
3.	bulion odżywczy nierozcieńczony BTL	ciecz – ciecz	10 ml 2,5% Na ₂ SO ₄ , 5 ml dichlorometanu	–	brak rozdziału faz
4.	bulion odżywczy nierozcieńczony BioCorp	ciecz – ciecz	10 ml 2,5% Na ₂ SO ₄ , 5 ml dichlorometanu	–	brak rozdziału faz
5.	bulion odżywczy nierozcieńczony BTL	ciecz – ciecz	5 ml acetonu Na ₂ SO ₄ bezwodny	–	brak rozdziału faz
6.	bulion odżywczy nierozcieńczony BioCorp	ciecz – ciecz	5 ml acetonu Na ₂ SO ₄ bezwodny	–	brak rozdziału faz
7.	bulion odżywczy nierozcieńczony BTL	Quechers; bez oczyszczania	8 ml acetonitrylu	>120	–
8.	bulion odżywczy nierozcieńczony BioCorp	Quechers; bez oczyszczania	8 ml acetonitrylu	>120	–
9.	bulion odżywczy nierozcieńczony BTL	Quechers z oczyszczaniem	8 ml acetonitrylu	<70	–
10.	bulion odżywczy nierozcieńczony BioCorp	Quechers z oczyszczaniem	8 ml acetonitrylu	<70	–
11.	bulion odżywczy nierozcieńczony BTL	ciecz – ciecz	odczynniki Carezza I i II, 5 ml dichlorometanu	–	brak rozdziału faz
12.	bulion odżywczy nierozcieńczony BioCorp	ciecz – ciecz	odczynniki Carezza I i II, 5 ml dichlorometanu	–	brak rozdziału faz
13.	M9	ciecz – ciecz	5 ml acetonu 5 ml dichlorometanu	74-118	brak przeżywalności bakterii
14.	bulion odżywczy 10-krotnie rozcieńczony BTL	ciecz – ciecz	5 ml acetonu 5 ml dichlorometanu	85-112	–
15.	bulion odżywczy 10-krotnie rozcieńczony BioCorp	ciecz – ciecz	5 ml acetonu 5 ml dichlorometanu	78-114	–
16.	bulion odżywczy 10-krotnie rozcieńczony BTL	ciecz – ciecz	5 ml acetonu Na ₂ SO ₄ bezwodny	74-103	–
17.	bulion odżywczy 10-krotnie rozcieńczony BioCorp	ciecz – ciecz	5 ml acetonu Na ₂ SO ₄ bezwodny	80-118	–
18.	PDB	ciecz – ciecz	5 ml acetonu 5 ml dichlorometanu	85-112	–
19.	PDB	ciecz – ciecz	5 ml acetonu Na ₂ SO ₄ bezwodny	83-97	–

Do badań wybrano bulion odżywczy 10-krotnie rozcieńczony i bulion glukozowo – ziemniaczany, dla których ekstrakcję substancji czynnych przeprowadzono w układzie ciecz-ciecz za pomocą acetonu oraz dodatku bezwodnego Na_2SO_4 .

W tabeli 14 przedstawiono dane z przeprowadzonej walidacji w podłożach hodowlanych: bulionie odżywczym 10-krotnie rozcieńczonym i bulionie glukozowo – ziemniaczanym. Walidację przeprowadzono z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej z detekcją mas. Przedstawione wyniki dotyczą badań: odzysków, poprawności, precyzji wyrażonej jako RSD oraz granicy oznaczalności dla substancji czynnych będących przedmiotem niniejszej pracy.

Tabela 14. Parametry walidacyjne metody: poprawność, precyzja (wyrażona jako RSD), granica oznaczalności (GO), matryca – podłoża hodowlane: BO - bulion odżywczy 10-krotnie rozcieńczony i PDB - bulion glukozowo – ziemniaczany

Substancja czynna	Podłoże	Poziom wzbogacenia [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Odzyski [%]					Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	GO [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
			I	II	III	IV	V				
Fluopyram	BO 10x rozc.	1	73,0	73,5	71,0	78,0	75,5	74,2	2,7	3,6	1
		100	87,3	89,0	94,0	94,0	96,0	92,1	3,7	4,0	
	PDB	1	96,0	79,0	96,4	88,0	98,0	91,5	8,0	8,7	1
		100	80,8	86,3	77,8	105,8	101,5	90,4	12,5	13,9	
Tebukonazol	BO 10x rozc.	1	74,5	82,0	90,5	97,0	86,5	86,1	8,5	9,9	1
		100	108,8	113,8	122,0	105,5	104,0	110,8	7,3	6,6	
	PDB	1	88,5	81,5	78,5	86,0	84,0	83,7	3,9	4,6	1
		100	104,3	110,5	105,3	104,0	102,0	105,2	3,2	3,0	
Boskalid	BO 10x rozc.	1	78,0	74,5	70,5	76,5	79,5	75,8	3,5	4,6	1
		100	82,0	84,8	87,0	81,5	79,8	83,0	2,9	3,5	
	PDB	1	85,5	87,5	83,5	81,0	89,5	85,4	3,3	3,9	1
		100	74,3	75,5	71,5	89,3	99,0	81,9	11,8	14,4	
Pyraklostrobina	BO 10x rozc.	1	87,5	75,0	83,0	84,5	78,5	81,7	5,0	6,1	1
		100	93,0	74,0	99,3	103,3	96,8	93,3	11,4	12,2	
	PDB	1	95,5	93,5	86,5	92,5	96,5	92,9	3,9	4,2	1
		100	92,5	98,3	91,0	87,5	94,0	92,7	4,0	4,3	
Pentiopirad	BO 10x rozc.	1	97,5	105,0	107,0	105,5	102,5	103,5	3,7	3,6	1
		100	117,5	121,0	113,8	113,3	115,5	116,2	3,2	2,7	
	PDB	1	89,0	88,5	109,5	98,5	102,0	97,5	8,9	9,2	1
		100	112,8	115,0	112,5	109,0	107,8	111,4	3,0	2,7	

Walidację wykonano dla dwóch poziomów wzbogacenia: 1 i 100 mg/kg. Dla wzorców przygotowanych w bulionie odżywczym 10-krotnie rozcieńczonym wyznaczona poprawność była w granicach od 74,2% do 116,2%. Precyzja dla badanych substancji czynnych była w zakresie od 2,7% do 12,2%. Dla wzorców przygotowanych w bulionie glukozowo – ziemniaczanym poprawność była w zakresie od 81,9% do 111,4%. Wyznaczona precyzja wyniosła 2,7%-14,4%. Według wskazań detektorów liniowością charakteryzowały się wszystkie badane substancje

czynne (współczynnik korelacji $R \geq 0,99$). W tabeli 15 zawarto dane dotyczące równań krzywych kalibracyjnych, współczynników korelacji, a także zakresy liniowości wskazań detektorów.

Tabela 15. Parametry walidacyjne – liniowość, matryca – podłoża hodowlane: BO - bulion odżywczy 10-krotnie rozcieńczony i PDB - bulion glukozowo – ziemniaczany

Substancja czynna	Podłoże	Liczba poziomów stężeń	Liniowość wskazań [mg/kg]	Równanie krzywej kalibracyjnej $y = ax + b$		Współczynnik korelacji R
				a	b	
Fluopyram	BO 10x rozc.	5	0,004-0,4	104478,7	-1443,1	0,9984
	PDB	5	0,004-0,4	114194,3	-1604,5	0,9984
Tebukonazol	BO 10x rozc.	5	0,004-0,4	438,4	1,3	0,9985
	PDB	5	0,004-0,4	562,1	2,3	0,9942
Boskalid	BO 10x rozc.	5	0,004-0,4	31802,4	-801,7	0,9964
	PDB	5	0,004-0,4	37131,5	-1072,3	0,9953
Pyraklostrobina	BO 10x rozc.	5	0,004-0,4	224,4	-1,6	0,9983
	PDB	5	0,004-0,4	204,3	-5,2	0,9991
Pentiopirad	BO 10x rozc.	5	0,004-0,4	348,9	20,8	0,9902
	PDB	5	0,004-0,4	443,2	28,2	0,9901

4.1.2 Oznaczanie substancji czynnych w jabłkach – walidacja metody

W tabeli 16 przedstawiono dane z przeprowadzonej walidacji metody oznaczania substancji czynnych fungicydów w matrycy jabłka. Wyniki dotyczą badań: odzysków, rodzaju detekcji, poprawności, precyzji (wyrażonej jako RSD) oraz granicy oznaczalności dla substancji czynnych będących przedmiotem niniejszej pracy.

Tabela 16. Parametry walidacyjne metody: poprawność, precyzja (wyrażona jako RSD), granica oznaczalności (GO), matryca - jabłko

Substancja czynna	Detektor	Poziom wzbogacenia [mg/kg]	Odzyski [%]					Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	GO [mg/kg]
			I	II	III	IV	V				
Fluopyram	μEC	0,01	119,0	118,0	121,3	115,0	110,5	116,8	4,2	3,6	0,01
		1	104,3	98,0	98,3	101,8	99,0	100,1	2,6	2,6	
	MS	0,01	119,5	112,0	117,0	110,5	113,0	114,4	3,7	3,3	0,01
		1	108,0	107,5	103,0	105,5	106,0	106,0	2,0	1,9	
Tebukonazol	μEC	0,01	120,0	118,0	115,0	115,3	110,0	115,7	3,8	3,3	0,01
		1	113,0	120,0	119,0	115,0	113,8	116,2	3,2	2,7	
	MS	0,01	94,5	93,0	89,0	86,5	91,0	90,8	3,2	3,5	0,01
		1	112,0	105,5	110,0	109,0	110,5	109,4	2,4	2,2	
Boskalid	μEC	0,01	111,0	117,0	108,0	112,0	108,0	111,2	3,7	3,3	0,01
		1	118,0	116,3	116,0	105,5	110,0	113,2	5,2	4,6	
	NP	0,01	95,0	90,5	92,5	93,0	95,0	93,2	1,9	2,0	0,01
		1	89,5	92,0	85,0	95,0	95,0	91,3	4,2	4,6	
	MS	0,01	119,0	119,5	112,0	119,0	119,5	117,8	3,3	2,8	0,01
		1	108,0	102,0	120,0	110,5	105,5	109,2	6,8	6,2	
Pyraklostrobina	μEC	0,01	103,0	101,3	91,0	95,0	98,5	97,7	4,8	4,9	0,01
		1	78,0	78,5	73,0	80,5	82,5	78,5	3,6	4,5	
	NP	0,01	80,5	82,0	79,0	80,0	79,5	80,2	1,2	1,4	0,01
		1	86,0	85,0	89,0	84,0	78,5	84,5	3,8	4,5	
	MS	0,01	96,0	99,5	85,0	90,0	92,5	92,6	5,6	6,0	0,01
		1	80,0	89,0	89,5	85,0	84,5	85,6	3,9	4,5	
Penthiopirad	μEC	0,01	109,5	106,0	95,3	100,5	110,5	104,4	6,4	6,1	0,01
		1	111,5	113,0	111,5	109,0	110,0	111,0	1,5	1,4	
	MS	0,01	118,0	118,5	117,0	112,5	110,0	115,2	3,7	3,3	0,01
		1	115,5	113,5	109	105	112,5	111,1	4,1	3,7	

Walidację przeprowadzono z wykorzystaniem detektorów: μEC, NP oraz MS. Wyznaczona poprawność dla dwóch poziomów wzbogacenia: 0,01 i 1 mg/kg mieściła się w zakresie: 78,5%-117,8%. Precyzja wynosiła odpowiednio od 1,4% do 6,2%. Dla wszystkich badanych substancji czynnych otrzymano liniową odpowiedź detektorów w zakresie stężeń 0,01-1 mg/l (współczynniki korelacji $\geq 0,99$). W tabeli 17 przedstawiono dane dotyczące równań krzywych kalibracyjnych, współczynników korelacji, a także zakresy liniowości wskazań detektorów. Otrzymane wyniki walidacji spełniają wymagania określone w dokumencie SANTE (średnie odzyski w zakresie 70-120% i $RSD \leq 20\%$) (SANTE 2015, SANTE 2017).

Tabela 17. Parametry walidacyjne – liniowość, matryca - jabłko

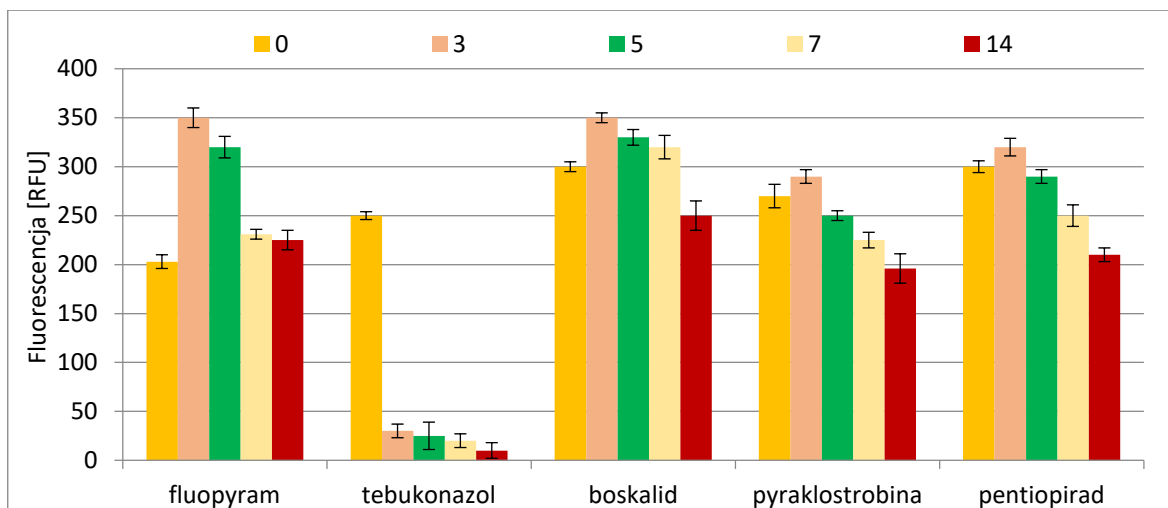
Substancja czynna	Detektor	Liczba poziomów stężeń	Liniowość wskazań [mg/kg]	Równanie krzywej kalibracyjnej $y = ax + b$		Współczynnik korelacji
				a	b	
Fluopyram	μEC	5	0,01-1	253453,4	-337,8	0,9991
	MS	5	0,01-1	32007,9	79,3	0,9995
Tebukonazol	μEC	5	0,01-1	852,0	5,5	0,9976
	MS	5	0,01-1	855,2	-6,75	0,9953
Boskalid	EC	5	0,01-1	39067,0	-247,7	0,9973
	NP	5	0,01-1	20,7	0,03	0,9950
	MS	5	0,01-1	3483,5	-18,5	0,9960
Pyraklostrobina	μEC	5	0,01-1	4094,5	46,3	0,9909
	NP	5	0,01-1	6,0	-0,14	0,9920
	MS	5	0,01-1	56,7	-0,04	0,9913
Pentiopirad	μEC	5	0,01-1	1066,8	15,3	0,9900
	MS	5	0,01-1	32915,6	8,1	0,9983

4.2 Doświadczenia laboratoryjne

4.2.1 Badania żywotności/aktywności metabolicznej komórek

Podczas badań degradacji pestycydów z wykorzystaniem bakterii *B. subtilis* przeprowadzono również testy żywotności komórek w podłożach w okresie 14 dni. Najmniejszą żywotnością charakteryzowały się komórki poddane działaniu tebukonazolu, natomiast największą żywotność wykazywały komórki w czasie badań degradacji z boskalidem. Wyniki testów dla badanych substancji przedstawiono na rysunku 21.

W czasie postępującej inkubacji komórek bakteryjnych w stosowanym podłożu, początkowo (dzień 3) obserwowano wzrost aktywności metabolicznej komórek, co pośrednio wskazywało na przyrost ich ilości. Przy dalszej hodowli, metaboliczna aktywność komórek spadała, co mogło wynikać z braku składników odżywczych, nagromadzenia się szkodliwych metabolitów i/lub hamującego działania samych środków chemicznych. Najintensywniejsze zahamowanie aktywności metabolicznej komórek obserwowano dla tebukonazolu.

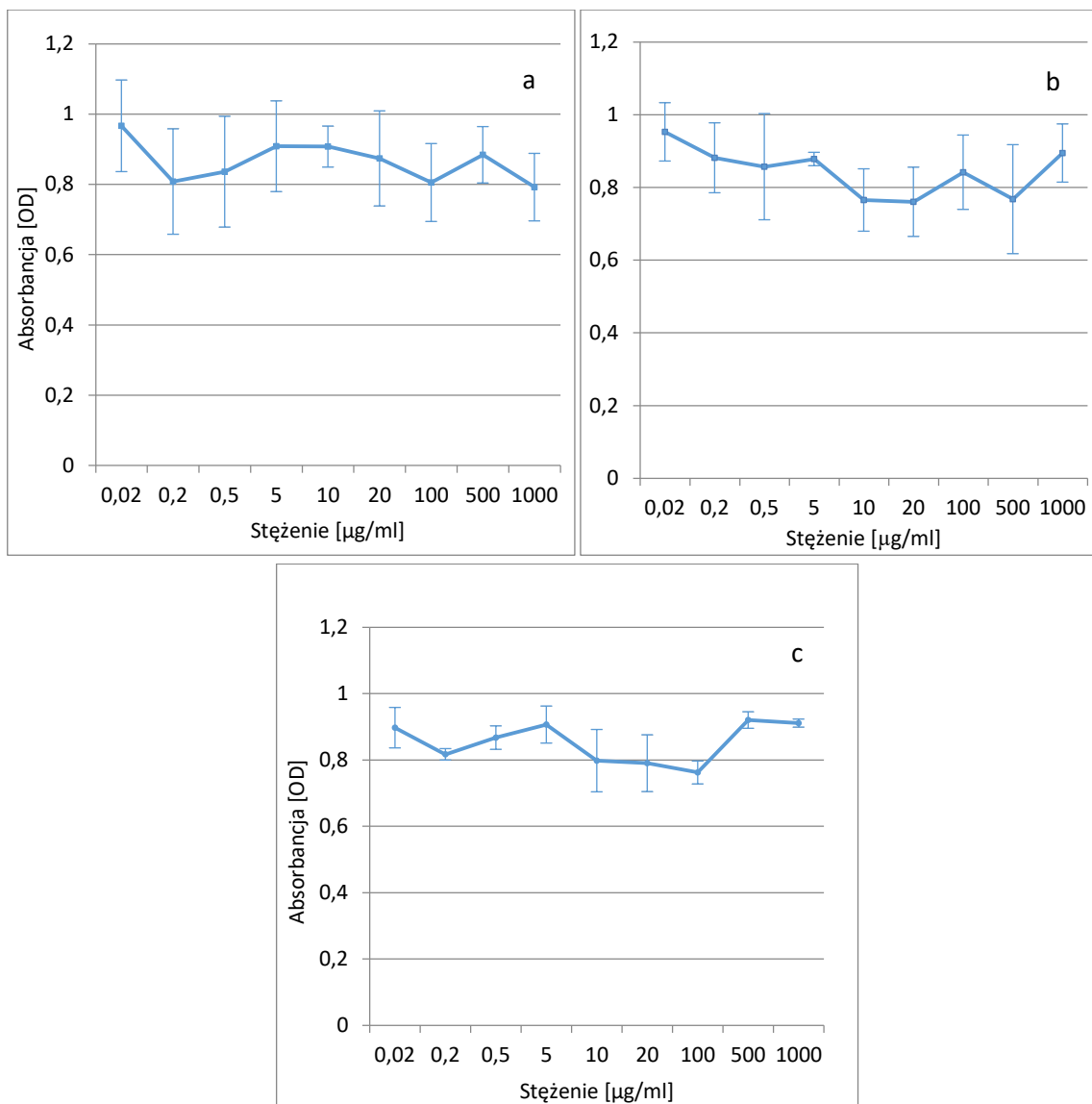


Rysunek 21. Żywotność komórek bakterii w czasie 14 dni trwania doświadczeń

4.2.2 Testy inhibicji wzrostu wobec bakterii *B. subtilis* i grzyba referencyjnego *S. cerevisiae*

Fungicydy mają szerokie spektrum oddziaływania na grzyby, brak jest jednak danych dotyczących wpływu tych fungicydów na bakterie *B. subtilis*. Z tego powodu w dalszych badaniach testowano w jakim stopniu/przy jakich stężeniach badane substancje czynne wykazują inhibicję wzrostu/bójczość zarówno w stosunku do szczepów grzyba referencyjnego jak i bakterii. Do analizy wybrano zakres stężeń substancji czynnych pomiędzy 0,02-1000 µg/ml. Jest to zakres, w którym mieszczą się stężenia substancji poddawane degradacji przez mikroorganizmy w badaniach laboratoryjnych jak i aplikowane podczas zabiegów w sadach jabłoniowych.

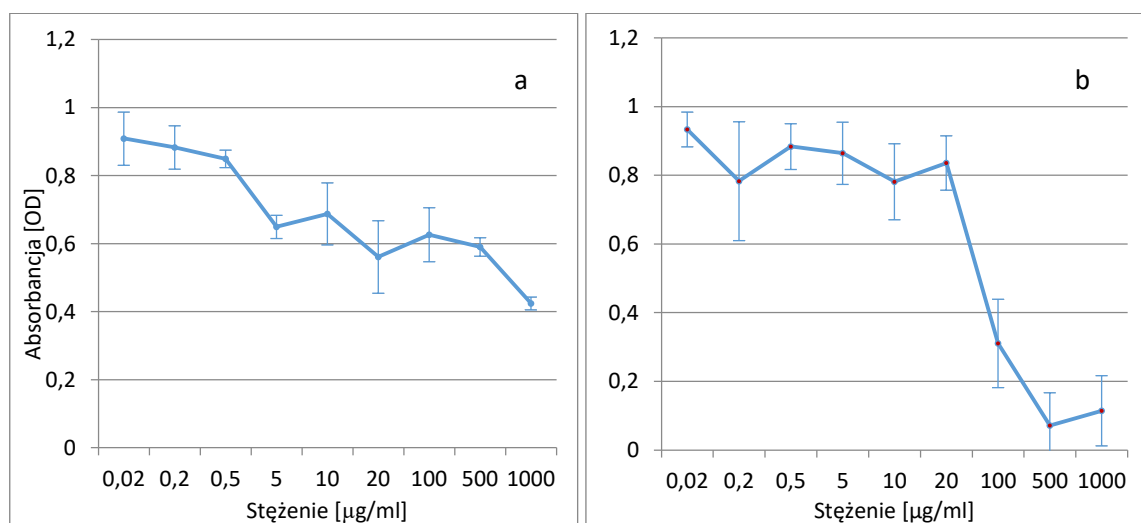
Po 24 godzinach ekspozycji bakterii *B. subtilis* na działanie substancji czynnych fungicydów nie obserwowano hamowania ich wzrostu przez fluopyram, boskalid i pentiopirad w testowanym zakresie stężeń. Odnotowano przyrost wartości absorbancji (wynikający ze zmętnienia hodowli), w stosunku do wartości w czasie „zerowym” (OD = 0,1). Świadczyło to o aktywnej proliferacji komórek i ich przyroście liczebnym, bez względu na dodane stężenie testowanego fungicydu (Rys. 22a-c). Z tego powodu dla tych związków w zakresie testowanych stężeń nie oznaczono wartości MIC i MBC.



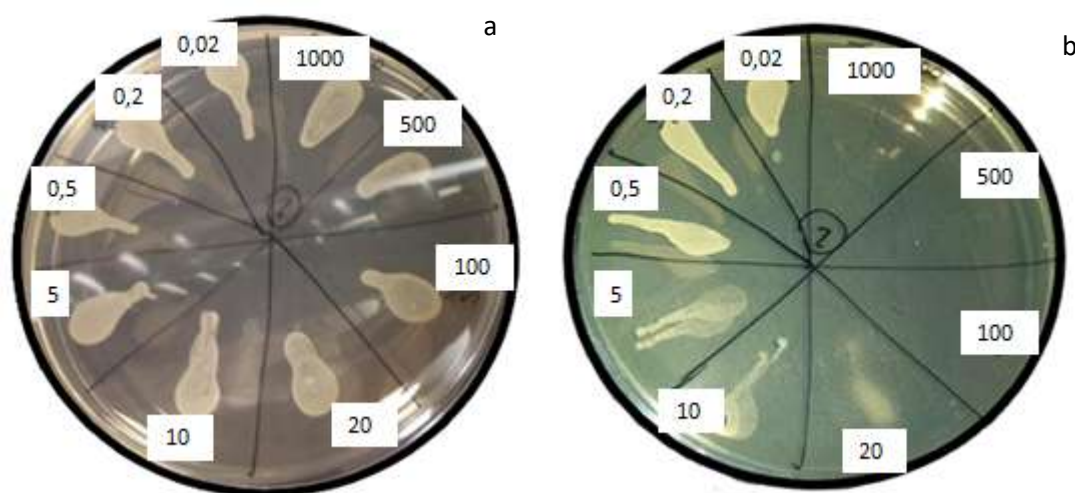
Rysunek 22. Wzrost po 24 godzinach szczepu *B. subtilis* po ekspozycji wobec (a) fluopyramu, (b) boskalidu, (c) pentiopiradu (0,02-1000 µg/ml)

W przypadku obecności pyraklostrobiny mniejszy wzrost absorbancji obserwowano dla bakterii inkubowanych w obecności stężenia 5 µg/ml (Rys. 23a), co sugeruje, że taka dawka hamuje wzrost testowanego szczepu. Tebukonazol inhibował wzrost komórek w stężeniu powyżej 20 µg/ml. Począwszy od stężenia 100 µg/ml i wyższego, związek ten silnie ograniczał przyrost komórek (Rys. 23b). Spadek absorbancji nie świadczy jednoznacznie jednak o działaniu bójącym. Z tego względu próbki, w których widoczne było zahamowanie wzrostu wobec pyraklostrobiny i tebukonazolu, poddano dalszej inkubacji, wysiewając je na płytki z odpowiednim podłożem i dalszej 24-ro godzinnej inkubacji. Po tym czasie oceniono intensywność wzrostu. W przypadku pyraklostrobiny niezależnie od zastosowanego stężenia wzrost był intensywny (Rys. 24a). Stąd, dla tego fungicydu oznaczono wartość MIC = 5 µg/ml, i brak wartości MBC. W przypadku

tebukonazolu, wraz ze wzrostem jego stężenia w hodowli, intensywność wzrostu malała, aż do całkowitego jego braku, zatem wartości MIC i MBC dla tebukonazolu wyniosły odpowiednio 20 $\mu\text{g/ml}$ i 100 $\mu\text{g/ml}$ (Rys. 23b i 24b).

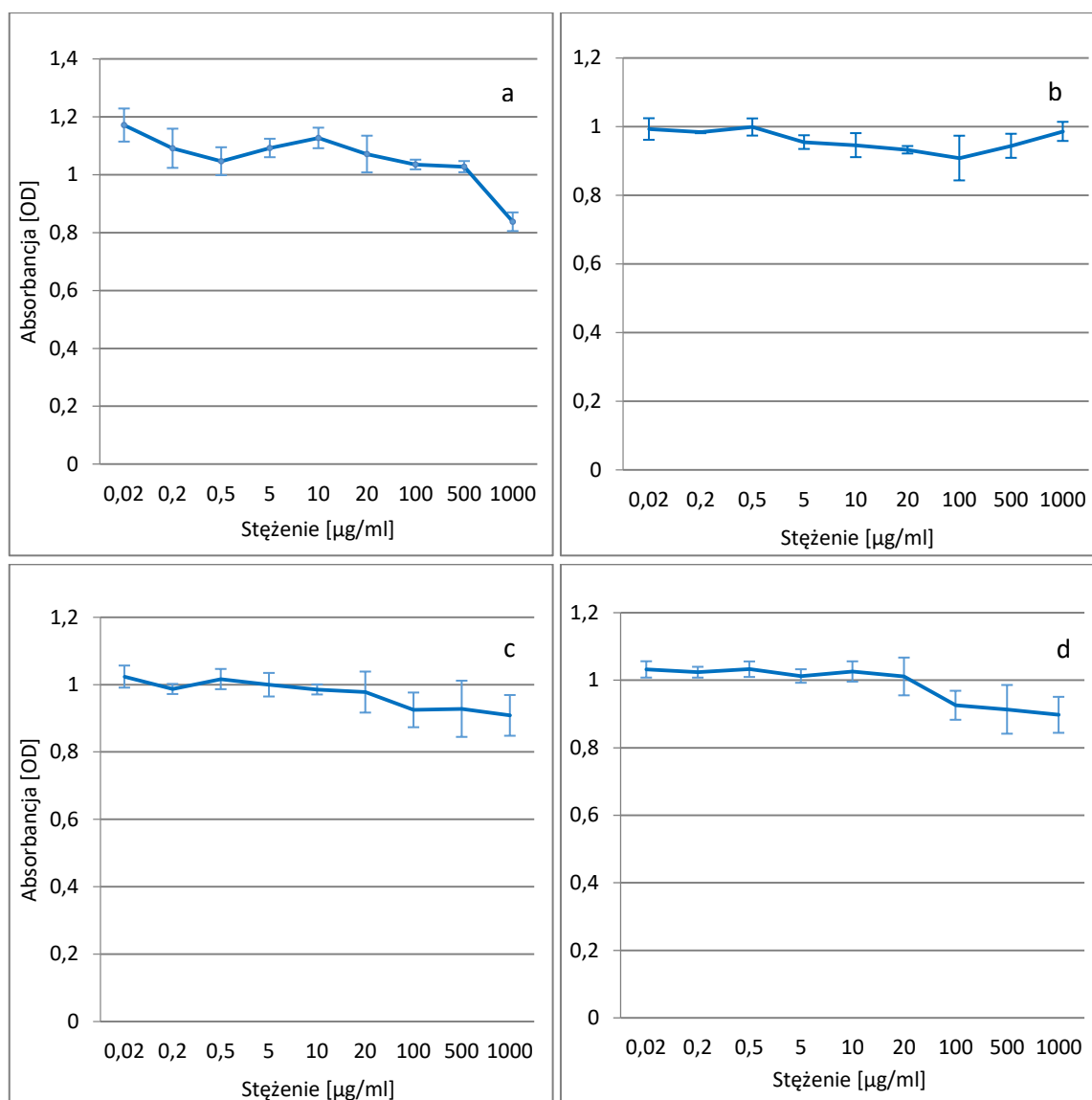


Rysunek 23. Wzrost po 24 godzinach szczepu *B. subtilis* po ekspozycji wobec (a) pyraklostrobiny, (b) tebukonazolu (0,02-1000 $\mu\text{g/ml}$)



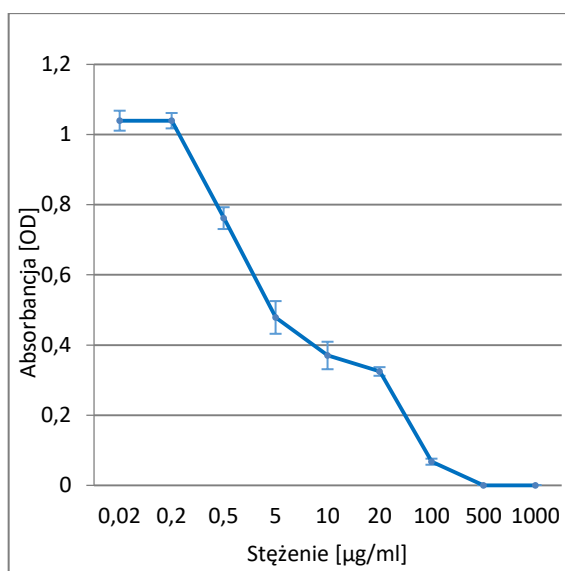
Rysunek 24. Wzrost po 24 godzinach szczepu *B. subtilis* po ekspozycji wobec (a) pyraklostrobiny, (b) tebukonazolu, (0,02-1000 $\mu\text{g/ml}$), test MBC

Aby porównawczo oszacować wpływ testowanych fungicydów na naturalnie bytujące mikroorganizmy obecne na powierzchni owoców, do testów MIC/MBC wybrano również szczep grzyba *S. cerevisiae*. W testowanym zakresie stężeń 0,02-1000 $\mu\text{g/ml}$ nie obserwowano negatywnego wpływu fluopyramu, boskalidu, pyraklostrobiny i pentiopiradu na intensywność wzrostu mikroorganizmów (Rys. 25a-d).

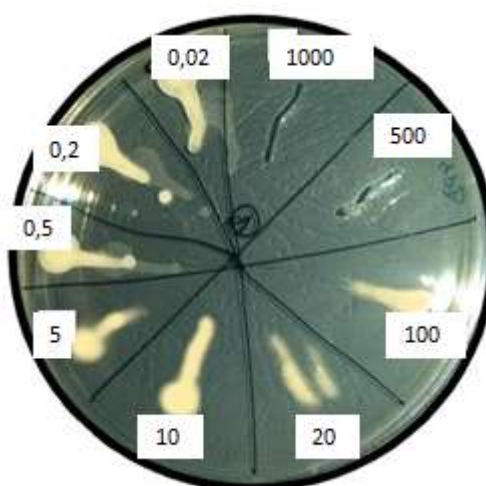


Rysunek 25. Wzrost po 24 godzinach szczepu *S. cerevisiae* po ekspozycji wobec (a) fluopyramu, (b) boskalidu, (c) pyraklostrobiny, (d) pentiopiradu (0,02-1000 µg/ml)

Podobnie jak w przypadku testowanego szczepu *B. subtilis*, również grzyby okazały się być najbardziej wrażliwe na tebukonazol. Zaobserwowano spadek absorbancji (a więc hamowanie wzrostu) od stężenia 0,2 µg/ml (Rys. 26). Po wykonaniu testu wzrostu na szalkach Petriego, określono wartość MBC, która wyniosła 500 µg/ml (Rys. 27). Prawdopodobnie, wartość ta może zawierać się w zakresie 100 i 500 µg/ml, jednak z powodu wybranych testowanych stężeń, całkowity brak wzrostu odnotowano dla stężenia wyższego.



Rysunek 26. Wzrost po 24 godzinach szczepu *S. cerevisiae* po ekspozycji wobec tebukonazolu (0,02-1000 µg/ml)



Rysunek 27. Wzrost po 24 godzinach szczepu *S. cerevisiae* po ekspozycji wobec tebukonazolu (0,02-1000 µg/ml), test MBC

4.2.3 Badanie degradacji substancji czynnych pestycydów przez bakterie *B. subtilis*

W badaniach degradacji substancji czynnych przez mikroorganizmy przeprowadzonych w laboratorium przebadano łącznie 270 próbek.

Doświadczenie 1

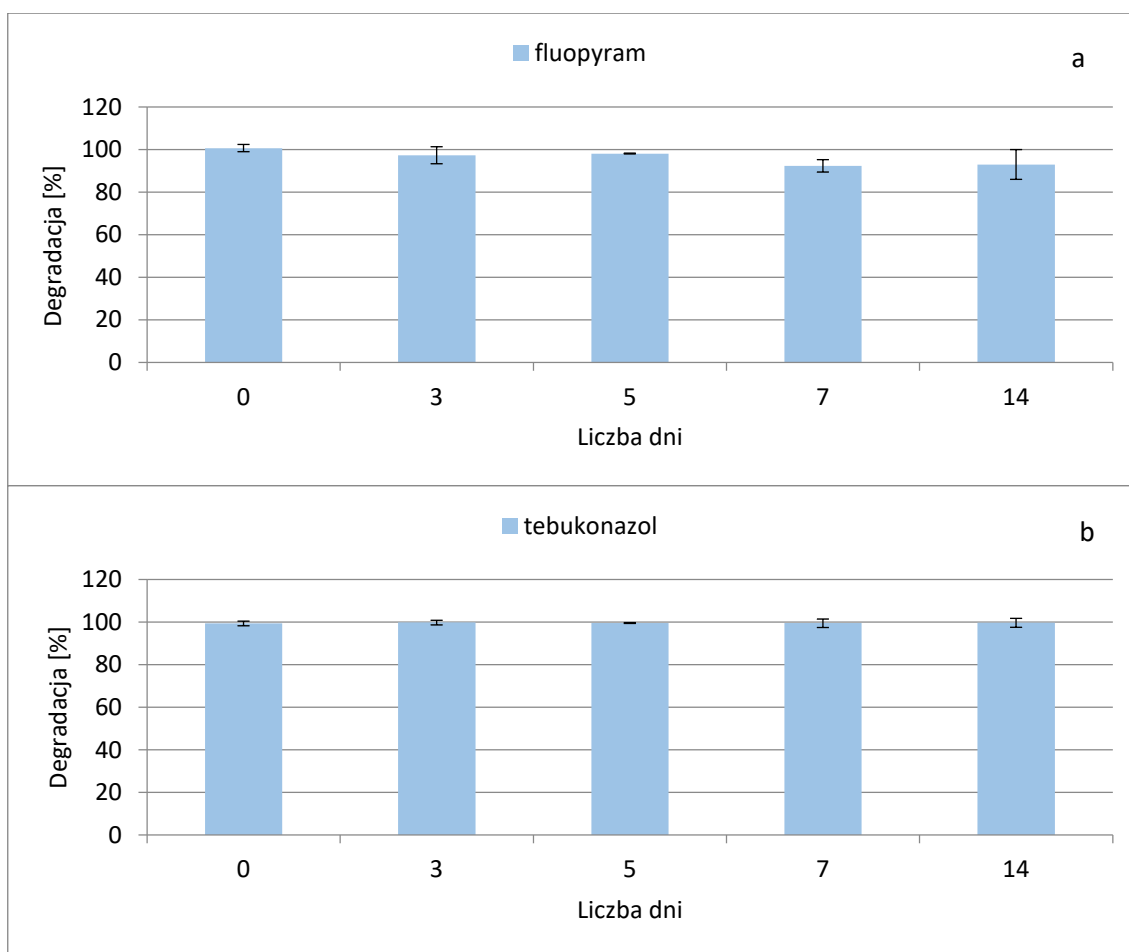
W doświadczeniu oceniono wpływ szczepów bakterii *B. subtilis* na degradację substancji czynnych: fluopyramu i tebukonazolu, zawartych w preparacie Luna Experience 400 SC. Stężenie fluopyramu oznaczone w zerowym dniu w próbkach kontrolnych było na poziomie $119,6 \pm 3,8$ $\mu\text{g/ml}$, w próbkach poddawanych degradacji $120,5 \pm 5,9$ $\mu\text{g/ml}$. Stężenie tebukonazolu w próbkach kontrolnych wyniosło $91,0 \pm 3,6$ $\mu\text{g/ml}$, natomiast w próbkach, w których zachodziła degradacja $90,5 \pm 2,5$ $\mu\text{g/ml}$. Próbki pobierano w warunkach sterylnych w 0, 3, 5, 7 i 14 dniu trwania doświadczenia.

Stężenia fluopyramu były w zakresie od $117,8 \pm 1,8$ $\mu\text{g/ml}$ – 3 dnia do $104,5 \pm 11,0$ $\mu\text{g/ml}$ – 14 dnia dla próbek kontrolnych i od $114,6 \pm 3,0$ $\mu\text{g/ml}$ – 3 dnia do $97,2 \pm 2,9$ $\mu\text{g/ml}$ – 14 dnia dla próbek poddawanych degradacji. 3 i 5 dnia pozostałości fluopyramu obniżyły się o ok. 2% w porównaniu do próbek kontrolnych, natomiast 7 dnia do 7,5%, a 14 dnia do 10% (Tab. 18, Rys. 28a).

W przypadku tebukonazolu stężenia w próbkach kontrolnych były w zakresie od $89,8 \pm 2,3$ $\mu\text{g/ml}$ – 5 dnia do $91,1 \pm 5,0$ $\mu\text{g/ml}$ – 14 dnia doświadczenia (Tab. 18). W próbkach poddawanych degradacji stężenie było w granicach od $89,5 \pm 2,1$ $\mu\text{g/ml}$ do $90,8 \pm 6,9$ $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 18). Obniżenie pozostałości tebukonazolu było w zakresie 0,2-0,5% (Tab. 18, Rys. 28b).

Tabela 18. Stężenia fluopyramu i tebukonazolu w próbkach kontrolnych oraz po aplikacji bakterii *B. subtilis*

Liczba dni	Fluopyram + <i>B. subtilis</i> [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	Fluopyram kontrola [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	Tebukonazol + <i>B. subtilis</i> [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	Tebukonazol kontrola [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]
0	120,5	5,9	119,6	3,8	90,5	2,5	91,0	3,6
3	114,6	3,0	117,8	1,8	90,2	3,3	90,4	2,3
5	109,9	0,9	112,0	0,7	89,5	2,1	89,9	2,3
7	98,3	0,4	106,4	3,7	90,6	8,2	91,1	1,1
14	97,2	2,9	104,5	11,0	90,8	6,9	91,1	5,0



Rysunek 28. Degradacja (a) fluopyramu, (b) tebukonazolu poddanych działaniu bakterii *B. subtilis*

Doświadczenie 2

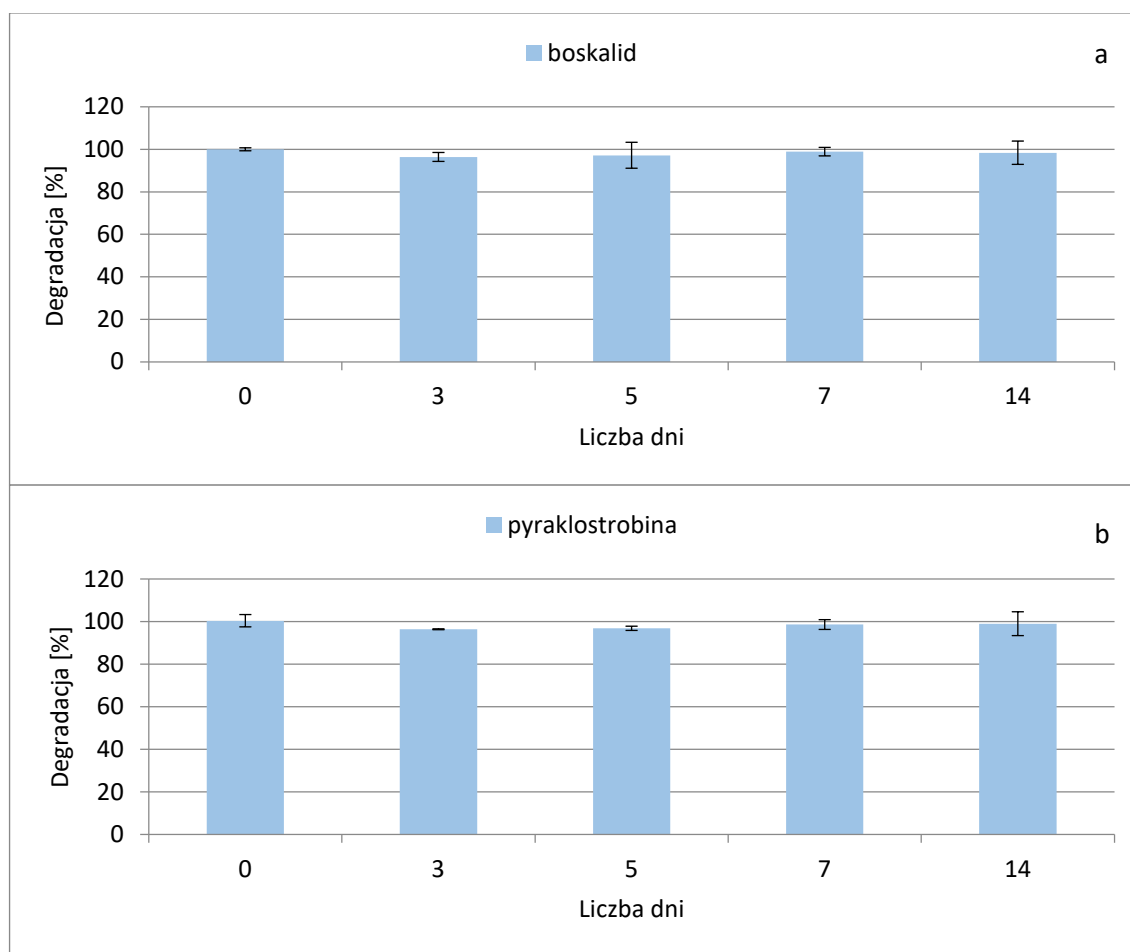
W doświadczeniu badano wpływ szczepów bakterii *B. subtilis* na degradację substancji czynnych: boskalidu i pyraklostrobiny, zawartych w preparacie Bellis 38 WG. Zawartość boskalidu w zerowym dniu była na poziomie $128,3 \pm 3,8$ $\mu\text{g/ml}$ w próbkach kontrolnych i $128,6 \pm 2,9$ $\mu\text{g/ml}$ w próbkach poddawanych degradacji. Stężenie pyraklostrobiny oznaczono na poziomie $70,0 \pm 5,2$ $\mu\text{g/ml}$ w próbkach kontrolnych i $70,3 \pm 3,3$ $\mu\text{g/ml}$ w próbkach poddawanych degradacji. Podczas doświadczenia pobierano próbki w warunkach sterylnych w 0, 3, 5, 7 i 14 dniu.

W trzecim dniu doświadczenia stężenie boskalidu w próbkach kontrolnych wyniosło $126,5 \pm 3,5$ $\mu\text{g/ml}$, a następnie obniżyło się do $121,0 \pm 7,2$ $\mu\text{g/ml}$ w 14 dniu. W próbkach z zaaplikowanymi szczepami bakterii zawartość boskalidu wynosiła od $122,0 \pm 0,7$ $\mu\text{g/ml}$ 3 dnia do $119,1 \pm 0,4$ $\mu\text{g/ml}$ – 14 dnia (Tab. 19). Stwierdzono degradację boskalidu w zakresie 0,6-3,6% (Rys. 29a).

Stężenie pyraklostrobiny w próbkach kontrolnych było w zakresie od $63,0 \pm 8,1$ $\mu\text{g/ml}$ do $68,3 \pm 5,9$ $\mu\text{g/ml}$. W próbkach poddanych działaniu bakterii stężenie wyniosło od $61,9 \pm 9,6$ $\mu\text{g/ml}$ do $65,9 \pm 5,8$ $\mu\text{g/ml}$. Szczegółowe wyniki doświadczenia przedstawiono w tabeli 19. W czasie trwania doświadczenia stwierdzono degradację pyraklostrobiny do 3,6% (Rys. 29b).

Tabela 19. Stężenia boskalidu i pyraklostrobiny w próbkach kontrolnych oraz po aplikacji szczepów bakterii *B. subtilis*

Liczba dni	Boskalid + <i>B. subtilis</i> [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	Boskalid kontrola [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	Pyraklostrobina + <i>B. subtilis</i> [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	Pyraklostrobina kontrola [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]
0	128,6	2,9	128,3	3,8	70,3	3,3	70,0	5,2
3	122,0	0,7	126,5	3,5	65,9	5,8	68,3	5,9
5	121,4	3,0	124,9	4,8	61,9	9,6	64,0	10,6
7	119,9	16,1	121,3	13,8	62,6	9,4	63,5	11,0
14	119,1	0,4	121,0	7,2	62,4	4,5	63,0	8,1



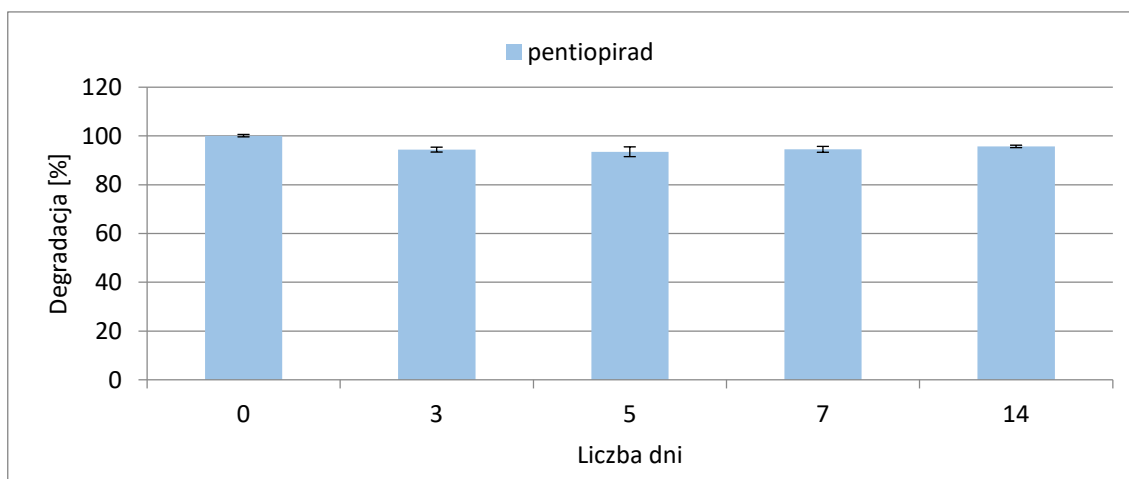
Rysunek 29. Degradacja (a) boskalidu, (b) pyraklostrobiny poddanych działaniu bakterii *B. subtilis*

Doświadczenie 3

W doświadczeniu testowano wpływ szczepów bakterii *B. subtilis* na degradację pentiopiradu, substancji czynnej zawartej w preparacie Fontelis 200 SC. Stężenie pentiopiradu w próbkach kontrolnych pobranych w zerowym dniu wynosiło $114,6 \pm 5,1$ $\mu\text{g/ml}$, natomiast w próbkach poddawanych degradacji $114,8 \pm 5,7$ $\mu\text{g/ml}$. Podczas doświadczenia pobierano próbki w warunkach sterylnych w 0, 3, 5, 7 i 14 dniu. Zawartość pentiopiradu była w zakresie od $104,0 \pm 4,2$ $\mu\text{g/ml}$ do $112,5 \pm 4,6$ $\mu\text{g/ml}$ w próbkach kontrolnych, z kolei w próbkach po aplikacji bakterii w zakresie od $98,4 \pm 4,8$ $\mu\text{g/ml}$ do $106,3 \pm 3,2$ $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 20). Degradacja badanej substancji czynnej wyniosła do 9,6% (Rys. 30).

Tabela 20. Stężenia pentiopiradu w próbkach kontrolnych oraz po aplikacji bakterii *B. subtilis*

Liczba dni	Pentiopirad + <i>B. subtilis</i> [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	Pentiopirad kontrola [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]
0	114,8	5,7	114,6	5,1
3	106,3	3,2	112,5	4,6
5	98,4	4,8	105,3	2,8
7	98,9	6,9	104,6	8,7
14	99,5	3,5	104,0	4,2

Rysunek 30. Degradacja pentiopiradu poddanego działaniu bakterii *B. subtilis*

W doświadczeniach 1-3 różnice pomiędzy wynikami dla próbek badanych i kontrolnych nie były istotne statystycznie (Rys. 28-30).

4.2.4 Badanie degradacji substancji czynnych pestycydów przez grzyba *T. harzianum*

Doświadczenie 4

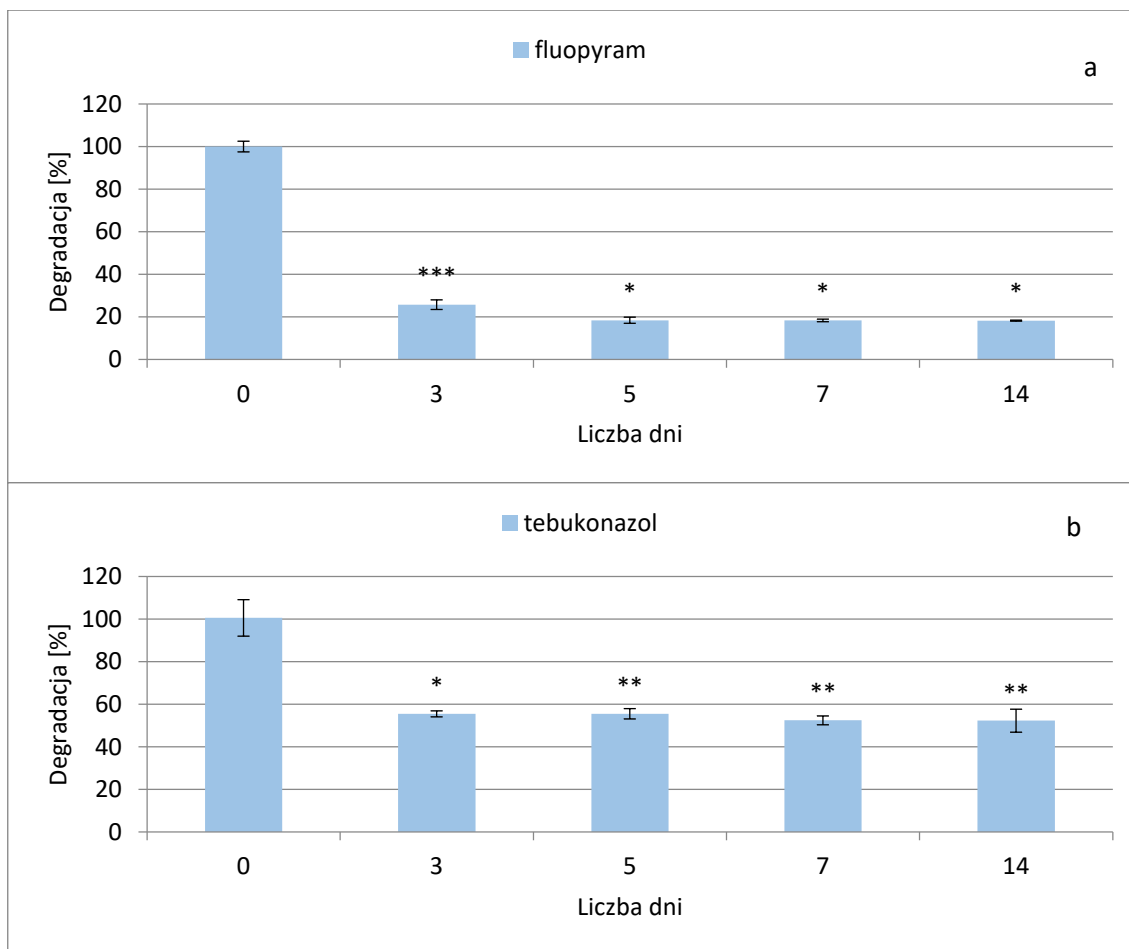
W doświadczeniu badano wpływ szczepów grzyba *T. harzianum* na degradację substancji czynnych fluopiramu i tebukonazolu, zawartych w preparacie Luna Experience 400 SC. Stężenie fluopiramu w zerowym dniu było na poziomie $112,0 \pm 2,1$ µg/ml w próbkach kontrolnych i $112,5 \pm 5,5$ µg/ml w próbkach poddawanych degradacji, natomiast stężenie tebukonazolu w próbkach kontrolnych było na poziomie $100,2 \pm 3,4$ µg/ml, a z zaaplikowanymi szczepami grzybów wyniosło $100,9 \pm 5,2$ µg/ml. Próbkę pobierano w warunkach sterylnych 0, 3, 5, 7 i 14 dnia.

Od trzeciego dnia doświadczenia w próbkach kontrolnych stężenie fluopiramu było w zakresie od $97,3 \pm 13,9$ µg/ml do $111,0 \pm 4,2$ µg/ml. W próbkach z zaaplikowanymi szczepami grzyba *T. harzianum* stężenie było od $28,5 \pm 1,4$ µg/ml 3 dnia do $17,8 \pm 2,5$ µg/ml 14 dnia (Tab. 21). Degradacja fluopiramu była na poziomie 74,3% 3 dnia, natomiast w kolejnych dniach od 81,5% do 81,7% (Rys. 31a).

W trzecim dniu doświadczenia stężenie tebukonazolu w próbkach kontrolnych wyniosło $92,3 \pm 12,2$ µg/ml, natomiast w 14 dniu $84,1 \pm 4,1$ µg/ml. W próbkach poddanych degradacji przez szczepy grzyba *T. harzianum* stężenie wyniosło od $51,1 \pm 5,5$ µg/ml 3 dnia do $42,8 \pm 2,5$ µg/ml 14 dnia (Tab. 21). Stopień degradacji tebukonazolu był w zakresie: 44,5-49,2% (Rys. 31b).

Tabela 21. Stężenia fluopiramu i tebukonazolu w próbkach kontrolnych oraz po aplikacji szczepów grzyba *T. harzianum*

Liczba dni	Fluopiram + <i>T. harzianum</i> [µg/ml]	SD [µg/ml]	Fluopiram kontrola [µg/ml]	SD [µg/ml]	Tebukonazol + <i>T. harzianum</i> [µg/ml]	SD [µg/ml]	Tebukonazol kontrola [µg/ml]	SD [µg/ml]
0	112,5	5,5	112,0	2,1	100,9	5,2	100,2	3,4
3	28,5	1,4	111,0	4,2	51,1	5,5	92,3	12,2
5	18,5	3,4	99,8	15,0	48,3	0,5	87,0	4,8
7	17,8	1,8	97,3	13,9	44,5	0,2	84,8	3,0
14	17,8	2,5	97,5	14,8	42,8	2,5	84,1	4,1



Rysunek 31. Degradacja (a) fluopyramu, (b) tebukonazolu poddanych działaniu grzyba *T. harzianum*

Doświadczenie 5

W doświadczeniu oceniano wpływ szczepów grzyba *T. harzianum* na degradację boskalidu i pyraklostrobiny, substancji czynnych preparatu chemicznego Bellis 38 WG. Początkowe stężenia badanych substancji czynnych były dla boskalidu na poziomie $145,0 \pm 4,7$ $\mu\text{g/ml}$ w próbkach kontrolnych i $145,7 \pm 5,9$ $\mu\text{g/ml}$ w próbkach poddawanych degradacji oraz dla pyraklostrobiny $64,5 \pm 2,5$ $\mu\text{g/ml}$ w próbkach kontrolnych i $65,5 \pm 4,0$ $\mu\text{g/ml}$ w próbkach, w których zachodziła degradacja. Próbkę do badań pobierano 0, 3, 5, 7 i 14 dnia.

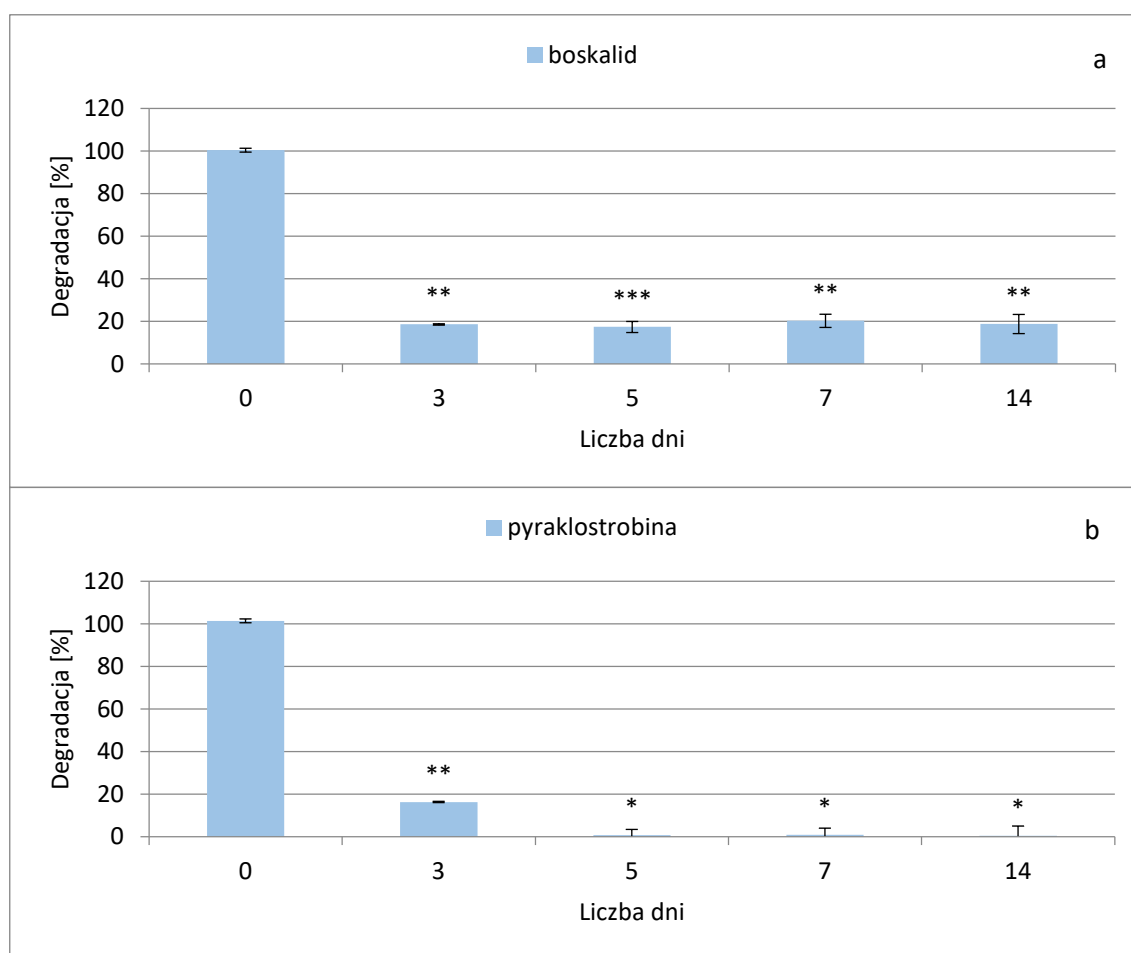
W trakcie trwania doświadczenia stwierdzono stężenie boskalidu w próbkach kontrolnych od $133,0 \pm 11,1$ $\mu\text{g/ml}$ do $144,9 \pm 5,5$ $\mu\text{g/ml}$, natomiast w próbkach poddanych ekspozycji grzybów w zakresie od $24,8 \pm 2,5$ $\mu\text{g/ml}$ do $27,3 \pm 2,5$ $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 22). Stwierdzono degradację boskalidu w zakresie: 79,6-82,5% (Rys. 32a).

Stężenie pyraklostrobiny w próbkach kontrolnych było w zakresie od $46,0 \pm 2,8$ $\mu\text{g/ml}$ do $51,8 \pm 9,9$ $\mu\text{g/ml}$, a w próbkach badanych w zakresie od $7,5 \pm 1,1$ $\mu\text{g/ml}$ 3 dnia do $0,3 \pm 0,1$ $\mu\text{g/ml}$

14 dnia (Tab. 22). 3 dnia stwierdzono degradację pyraklostrobiny o 83,7%, natomiast w kolejnych dniach doświadczenia od 99,2% do 99,4% (Rys. 32b).

Tabela 22. Stężenia boskalidu i pyraklostrobiny w próbkach kontrolnych oraz po aplikacji szczepów grzyba *T. harzianum*

Liczba dni	Boskalid + <i>T. harzianum</i> [µg/ml]	SD [µg/ml]	Boskalid kontrola [µg/ml]	SD [µg/ml]	Pyraklostrobina + <i>T. harzianum</i> [µg/ml]	SD [µg/ml]	Pyraklostrobina kontrola [µg/ml]	SD [µg/ml]
0	145,7	5,9	145,0	4,7	65,5	4,0	64,5	2,5
3	24,8	2,5	133,0	11,1	7,5	1,1	46,0	2,8
5	25,3	2,8	144,9	5,5	0,4	0,1	51,8	9,9
7	27,3	2,5	134,0	8,1	0,4	0,1	46,8	16,7
14	25,3	3,2	134,3	14,8	0,3	0,1	51,0	8,0



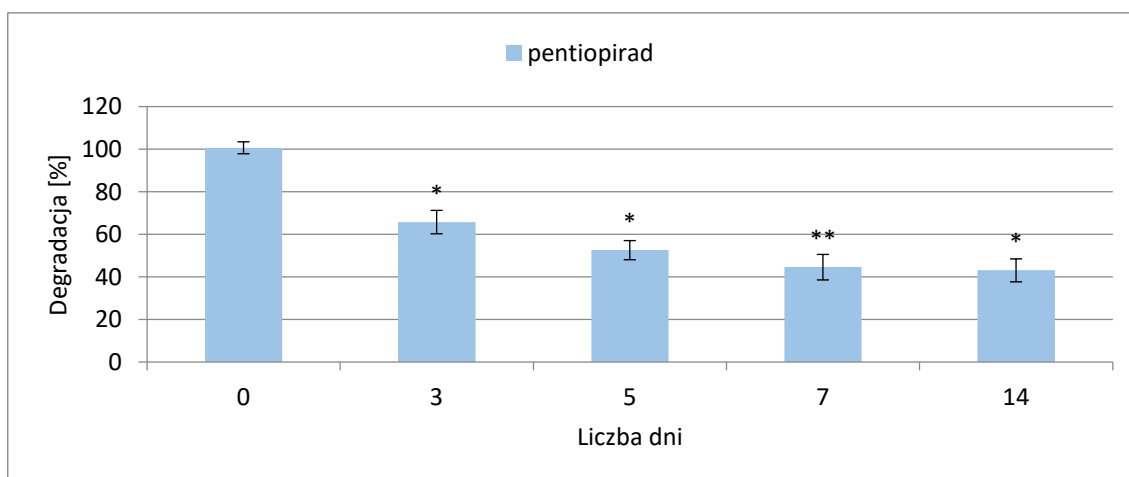
Rysunek 32. Degradacja (a) boskalidu, (b) pyraklostrobiny poddanych działaniu grzyba *T. harzianum*

Doświadczenie 6

W doświadczeniu testowano wpływ szczepów grzyba *T. harzianum* na degradację pentiopiradu, substancji czynnej preparatu Fontelis 200 SC. Początkowe stężenie pentiopiradu aplikowanego w doświadczeniu oznaczono na poziomie $106,0 \pm 2,5$ $\mu\text{g/ml}$ w próbkach kontrolnych, a w próbkach poddanych degradacji na poziomie $106,7 \pm 5,4$ $\mu\text{g/ml}$. Próbki do badań pobierano 0, 3, 5, 7 i 14 dnia. Zawartość pentiopiradu w próbkach kontrolnych oznaczono w zakresie od $105,0 \pm 2,8$ $\mu\text{g/ml}$ 3 dnia do $99,4 \pm 5,1$ $\mu\text{g/ml}$ 14 dnia, natomiast w próbkach poddanych degradacji stężenie 3 dnia wyniosło $69,1 \pm 7,6$ $\mu\text{g/ml}$, a 14 dnia $42,9 \pm 7,6$ $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 23). Stopień rozkładu pentiopiradu był w zakresie od 34,2% (3 dzień) do 56,9% (14 dzień) (Rys. 33).

Tabela 23. Stężenia pentiopiradu w próbkach kontrolnych oraz po aplikacji grzyba *T. harzianum*

Liczba dni	Pentiopirad + <i>T. harzianum</i> [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	Pentiopirad kontrola [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]
0	106,7	5,4	106,0	2,5
3	69,1	7,6	105,0	2,8
5	54,2	3,8	101,8	15,6
7	45,3	3,2	101,4	6,5
14	42,9	7,6	99,4	5,1

Rysunek 33. Degradacja pentiopiradu poddanego działaniu grzyba *T. harzianum*

W doświadczeniach 4-6 różnice pomiędzy wynikami dla próbek badanych i kontrolnych były istotne statystycznie, co przedstawiono na rysunkach 31-33.

4.2.5 Badanie degradacji substancji czynnych pestycydów przez mieszaną kulturę bakterii *B. subtilis* i grzyba *T. harzianum*

Doświadczenie 7

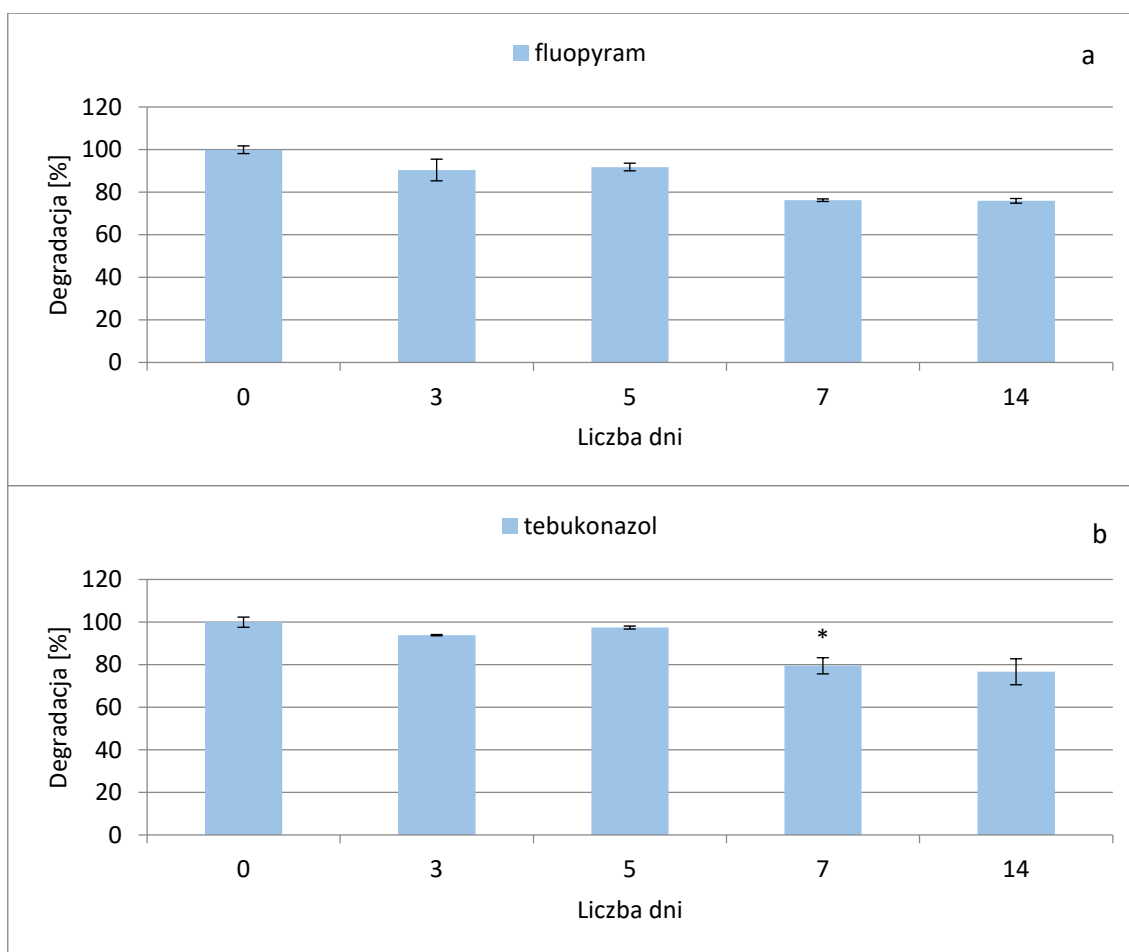
W doświadczeniu badano wpływ szczepów mieszanej kultury bakterii *B. subtilis* oraz grzyba *T. harzianum* na degradację fluopiramu i tebukonazolu, substancji czynnych preparatu Luna Experience 400 SC. Stężenie fluopiramu aplikowanego do podłoża oznaczono na poziomie $112,2 \pm 6,0$ $\mu\text{g/ml}$ w próbkach kontrolnych oraz $112,0 \pm 4,0$ $\mu\text{g/ml}$ w próbkach poddawanych degradacji. Stężenie tebukonazolu oznaczono na poziomie $90,0 \pm 4,3$ $\mu\text{g/ml}$ w próbkach kontrolnych i $90,4 \pm 6,6$ $\mu\text{g/ml}$ w próbkach poddawanych degradacji. Próbkę pobierano 0, 3, 5, 7 i 14 dnia.

Stężenie fluopiramu było na poziomie $110,8 \pm 4,8$ $\mu\text{g/ml}$ 3 dnia i obniżyło się do poziomu $108,0 \pm 12,6$ $\mu\text{g/ml}$ 14 dnia w próbkach kontrolnych, natomiast w próbkach poddanych ekspozycji bakterii i grzybów stężenie było w zakresie od $82,0 \pm 8,3$ $\mu\text{g/ml}$ do $100,4 \pm 8,0$ $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 24). W trakcie trwania doświadczenia stopień rozkładu fluopiramu był w zakresie od 8,3% do 24,1% (Rys. 34a).

Stężenie tebukonazolu w próbkach kontrolnych oznaczono na poziomie od $80,8 \pm 3,9$ $\mu\text{g/ml}$ do $82,5 \pm 10,4$ $\mu\text{g/ml}$, z kolei w próbkach poddanych degradacji przez bakterie i grzyby w zakresie od $63,3 \pm 3,0$ $\mu\text{g/ml}$ do $76,8 \pm 6,9$ $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 24). Procentową degradację tebukonazolu wyznaczono w zakresie od 2,5% 5 dnia do 23,3% 14 dnia (Rys. 34b).

Tabela 24. Stężenia fluopiramu i tebukonazolu w próbkach kontrolnych oraz po aplikacji szczepów bakterii *B. subtilis* i grzyba *T. harzianum*

Liczba dni	Fluopiram + <i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i> [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	Fluopiram kontrola [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	Tebukonazol + <i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i> [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	Tebukonazol kontrola [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]
0	112,0	4,0	112,2	6,0	90,4	6,6	90,0	4,3
3	100,0	9,9	110,8	4,8	76,8	6,9	81,8	7,6
5	100,4	8,0	109,5	10,8	74,3	6,0	80,8	3,9
7	82,8	7,2	108,5	7,8	64,5	2,1	81,0	1,2
14	82,0	8,3	108,0	12,6	63,3	3,0	82,5	10,4



Rysunek 34. Degradacja (a) fluopyramu (b) tebukonazolu poddanych działaniu bakterii *B. subtilis* i grzyba *T. harzianum*

Doświadczenie 8

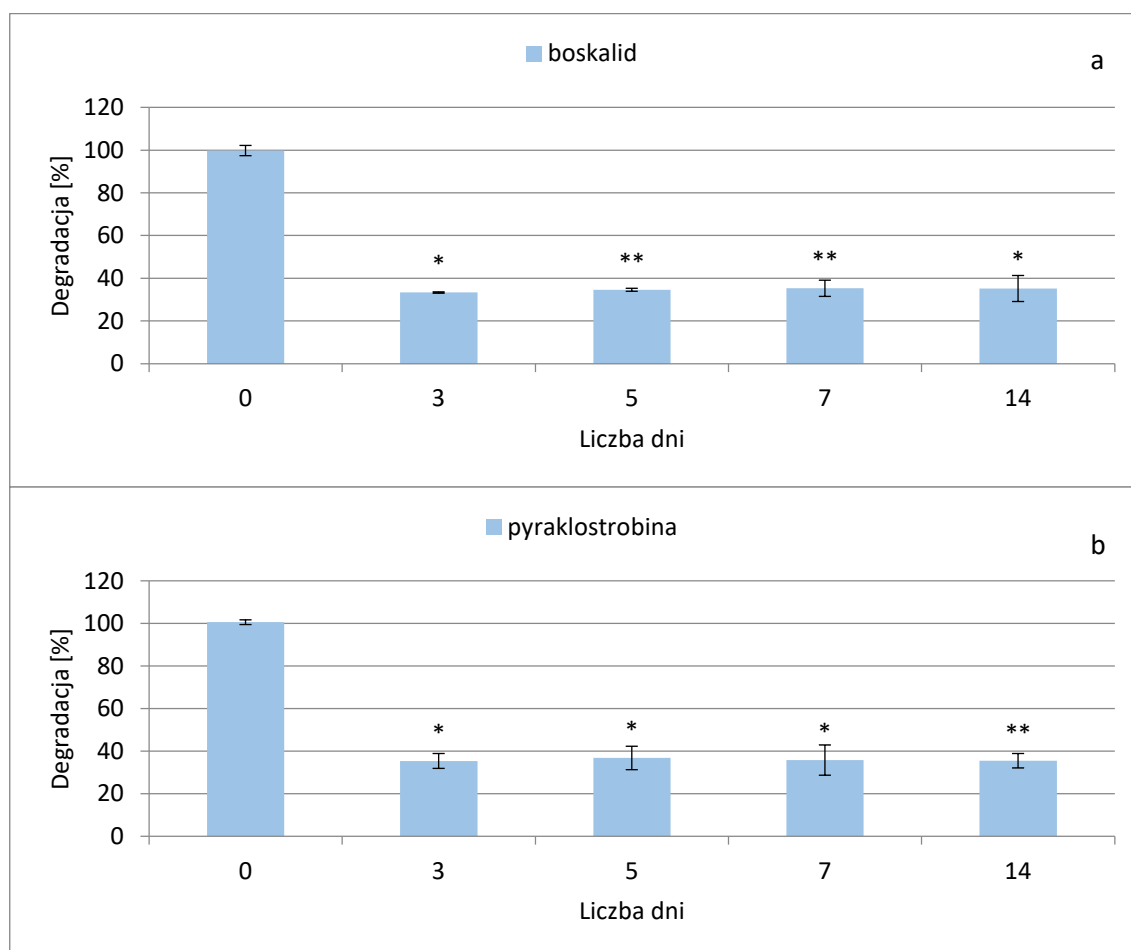
W doświadczeniu oceniano wpływ mieszanej kultury bakterii *B. subtilis* i grzyba *T. harzianum* na degradację boskalidu i pyraklostrobiny substancji czynnych preparatu Bellis 38 WG. Stężenie boskalidu oznaczone zerowego dnia było na poziomie $145,0 \pm 4,6 \mu\text{g/ml}$ w próbkach kontrolnych i $144,7 \pm 5,4 \mu\text{g/ml}$ w próbkach poddanych degradacji przez bakterie i grzyby, natomiast stężenie pyraklostrobiny wyniosło $70,0 \pm 3,8 \mu\text{g/ml}$ w próbkach kontrolnych i $70,4 \pm 2,3 \mu\text{g/ml}$ w próbkach poddanych degradacji. Próbkę pobierano 0, 3, 5, 7 i 14 dnia.

W próbkach kontrolnych 3 dnia stężenie boskalidu oznaczono na poziomie $141,3 \pm 10,8 \mu\text{g/ml}$, natomiast 14 dnia trwania doświadczenia na poziomie $118,8 \pm 13,8 \mu\text{g/ml}$. W próbkach poddanych działaniu szczepów bakterii i grzybów stężenie boskalidu było w zakresie od $41,8 \pm 6,7 \mu\text{g/ml}$ do $47,3 \pm 5,3 \mu\text{g/ml}$ (Tab. 25). Procentową degradację boskalidu oznaczono w zakresie 64,7-66,8% (Rys. 35a).

Stężenie pyraklostrobiny było w zakresie $61,3 \pm 2,8$ - $68,0 \pm 11,0$ $\mu\text{g/ml}$ w próbkach kontrolnych, natomiast w próbkach poddanych degradacji przez mikroorganizmy od $21,8 \pm 1,1$ $\mu\text{g/ml}$ do $23,8 \pm 7,0$ $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 25). Stwierdzono degradację pyraklostrobiny od 63,2% do 64,6% (Rys. 35b).

Tabela 25. Stężenia boskalidu i pyraklostrobiny w próbkach kontrolnych oraz po aplikacji szczepów bakterii *B. subtilis* i grzyba *T. harzianum*

Liczba dni	Boskalid + <i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i> [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	Boskalid kontrola [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	Pyraklostrobina + <i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i> [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	Pyraklostrobina kontrola [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]
0	144,7	5,4	145,0	4,6	70,4	2,3	70,0	3,8
3	47,0	11,3	141,3	10,8	24,4	1,5	68,0	11,0
5	47,3	5,3	136,8	11,5	23,8	7,0	66,9	9,4
7	42,1	6,2	119,8	6,2	23,3	8,2	65,0	10,3
14	41,8	6,7	118,8	13,8	21,8	1,1	61,3	2,8



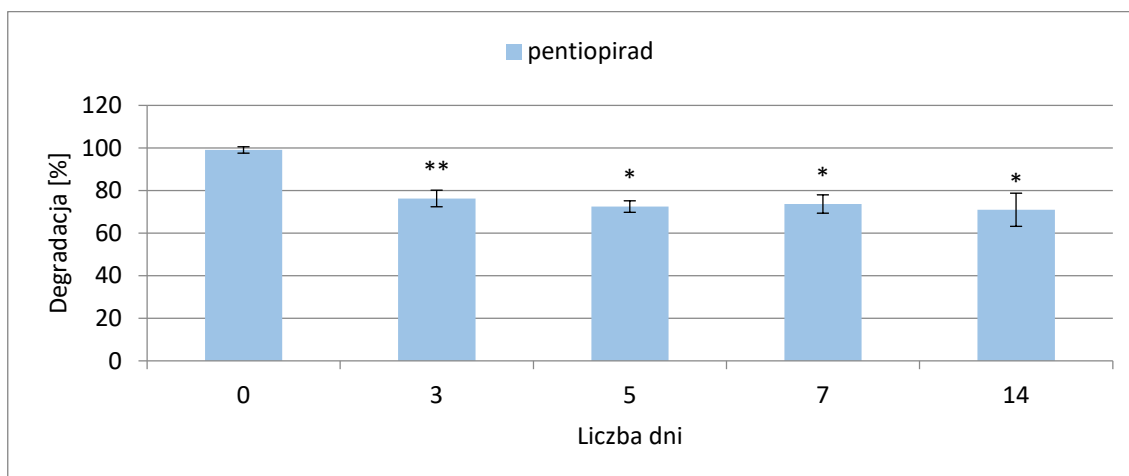
Rysunek 35. Degradacja (a) boskalidu, (b) pyraklostrobiny poddanych działaniu bakterii *B. subtilis* i grzyba *T. harzianum*

Doświadczenie 9

W doświadczeniu testowano wpływ mieszanej kultury bakterii *B. subtilis* i grzyba *T. harzianum* na degradację pentiopiradu, substancji czynnej preparatu Fontelis 200 SC. Próbkę do badań pobierano 0, 3, 5, 7 i 14 dnia. Stężenie pentiopiradu w próbkach kontrolnych w zerowym dniu było na poziomie $110,6 \pm 2,4$ $\mu\text{g/ml}$, natomiast w próbkach poddanych degradacji wyniosło $109,8 \pm 4,3$ $\mu\text{g/ml}$. W czasie trwania doświadczenia stężenie pentiopiradu było w zakresie od $100,8 \pm 6,0$ $\mu\text{g/ml}$ do $109,3 \pm 5,7$ $\mu\text{g/ml}$ w próbkach kontrolnych. W próbkach poddanych degradacji przez mikroorganizmy stężenie wyniosło od $71,5 \pm 3,5$ $\mu\text{g/ml}$ do $80,3 \pm 2,1$ $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 26). Oznaczano degradację pentiopiradu w zakresie 23,7-29,1% (Rys. 36).

Tabela 26. Stężenia pentiopiradu w próbkach kontrolnych oraz po aplikacji szczepów bakterii *B. subtilis* i grzyba *T. harzianum*

Liczba dni	Pentiopirad + + <i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i> [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	Pentiopirad kontrola [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]
0	109,8	4,3	110,6	2,4
3	80,3	2,1	105,3	2,7
5	79,3	7,1	109,3	5,7
7	77,5	8,8	105,1	5,8
14	71,5	3,5	100,8	6,0



Rysunek 36. Degradacja pentiopiradu poddanego działaniu bakterii *B. subtilis* i grzyba *T. harzianum*

W doświadczeniach 7-9 różnice pomiędzy wynikami dla próbek badanych i kontrolnych były istotne statystycznie dla 3 badanych substancji czynnych: boskalidu, pyraklostrobiny

i pentiopiradu (Rys. 35, 36). Dla tebukonazolu stwierdzono różnice istotne statystycznie tylko w siódmym dniu doświadczenia, natomiast dla fluopiramu nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie (Rys. 34a i b).

4.3 Doświadczenia polowe

W latach 2016–2018 przeprowadzono 6 doświadczeń polowych na 5 odmianach jabłoni, stosując 3 preparaty chemiczne: Bellis 38 WG (substancje czynne: boskalid, pyraklostrobina), Luna Experience 400 SC (substancje czynne: fluopiram, tebukonazol) i Fontelis 200 SC (substancja czynna: pentiopirad) oraz komercyjny preparat biologiczny Zumba Plant®. W każdym przeprowadzonym doświadczeniu pobierano łącznie 40 próbek jabłek, ogółem w doświadczeniach polowych przebadano 240 próbek.

W tabelach 27-36 przedstawiono wyniki przeprowadzonych doświadczeń uwzględniając terminy pobierania próbek i poziomy pozostałości badanych substancji czynnych zarówno po zabiegach preparatami chemicznymi jak i preparatem biologicznym. Z otrzymanych wyników badań określono zależności pomiędzy stężeniem substancji czynnej i czasem jej rozkładu. Wyznaczono krzywe zanikania substancji czynnych w jabłkach, stosując model matematyczny opisujący równanie kinetyczne dla reakcji pierwszego rzędu. Z wyznaczonych równań obliczono czas połowicznego zanikania ($t_{1/2}$) charakteryzujący trwałość substancji. O poprawności wybranego modelu świadczy wyznaczony (wysoki) współczynnik korelacji (R).

4.3.1 Doświadczenie 1

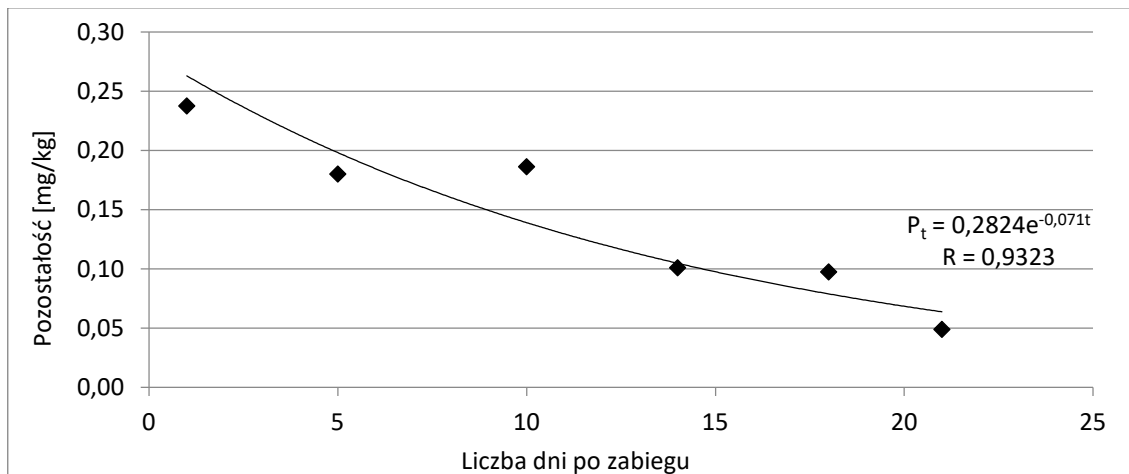
Zabieg na odmianie Gloster w sadzie w Józefowie nad Wisłą wykonano w całej kwaterze preparatem Bellis 38 WG w dawce 0,8 kg/ha zawierającym substancje czynne boskalid i pyraklostrobinę w dawkach odpowiednio 252 g/kg (25,2%) i 128 g/kg (12,8%). Zabieg przeprowadzono 23 września 2016, następnego dnia (12 godzin po wykonanym zabiegu, 24.09.2016) rozpoczęto pobieranie próbek i kontynuowano: 28 września, 3, 7, 11 i 14 października. Następnie 29 września 2016 w bloku II (Rys. 13) wykonano zabieg preparatem biologicznym Zumba Plant®. Próbki po zabiegu oraz próbki stanowiące kontrolę pobrano 3, 7, 11 i 14 października 2016.

Boskalid

Pozostałości boskalidu następnego dnia po zabiegu preparatem chemicznym wyniosły $0,238 \pm 0,166$ mg/kg (Tab. 27) i obniżały się zgodnie z równaniem wykładniczym: $P_t = 0,2824e^{-0,071t}$ ($R = 0,9323$) (Rys. 37). Z równania wyznaczono czas połowicznego zaniku $t_{1/2}$ wynoszący 9,8 dnia. W dniu zbioru owoców pozostałości boskalidu wyniosły $0,049 \pm 0,007$ mg/kg. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 27.

Tabela 27. Terminy pobierania próbek i poziomy pozostałości boskalidu po zabiegach: 23.09.2016 preparatem Bellis 38 WG i 29.09.2016 preparatem Zumba Plant® na odmianie Gloster

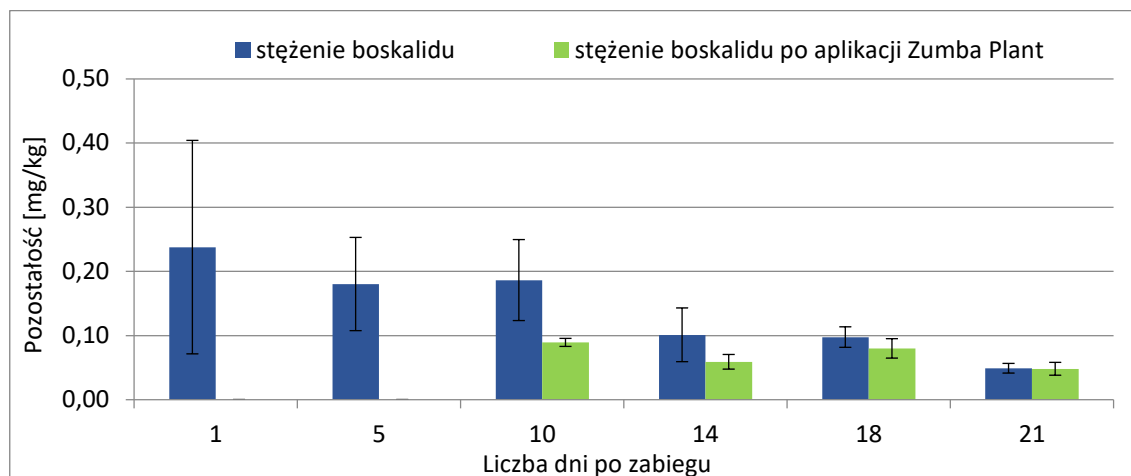
Data poboru próbek	Liczba dni po zabiegu preparatem chemicznym	Stężenie boskalidu [mg/kg]	SD [mg/kg]	Stężenie boskalidu po zabiegu preparatem biologicznym [mg/kg]	SD [mg/kg]
24.09.2016	1	0,238	0,166	–	–
28.09.2016	5	0,180	0,073	–	–
03.10.2016	10	0,186	0,063	0,089	0,006
07.10.2016	14	0,101	0,042	0,059	0,011
11.10.2016	18	0,097	0,016	0,080	0,015
14.10.2016	21	0,049	0,007	0,048	0,010



Rysunek 37. Krzywa zanikania boskalidu po zabiegu preparatem Bellis 38 WG – 23.09.2016 na odmianie Gloster

Po aplikacji preparatu biologicznego Zumba Plant® pozostałości boskalidu wyniosły $0,089 \pm 0,006$ mg/kg, natomiast w dniu zbioru pozostałości osiągnęły wartość $0,048 \pm 0,010$ mg/kg (Tab. 27). Bezpośrednio po zastosowaniu preparatu biologicznego pozostałości boskalidu obniżyły się o 52% (Tab. 27, Rys. 38). W kolejnych terminach pozostałości boskalidu były niższe niż w próbach kontrolnych odpowiednio o 42% i 13% (Tab. 27, Rys. 38). W dniu zbioru pozostałości

osiągnęły niemal tę samą wartość co w próbkach kontrolnych ($0,048 \pm 0,010$ mg/kg) (Tab. 27, Rys. 38).



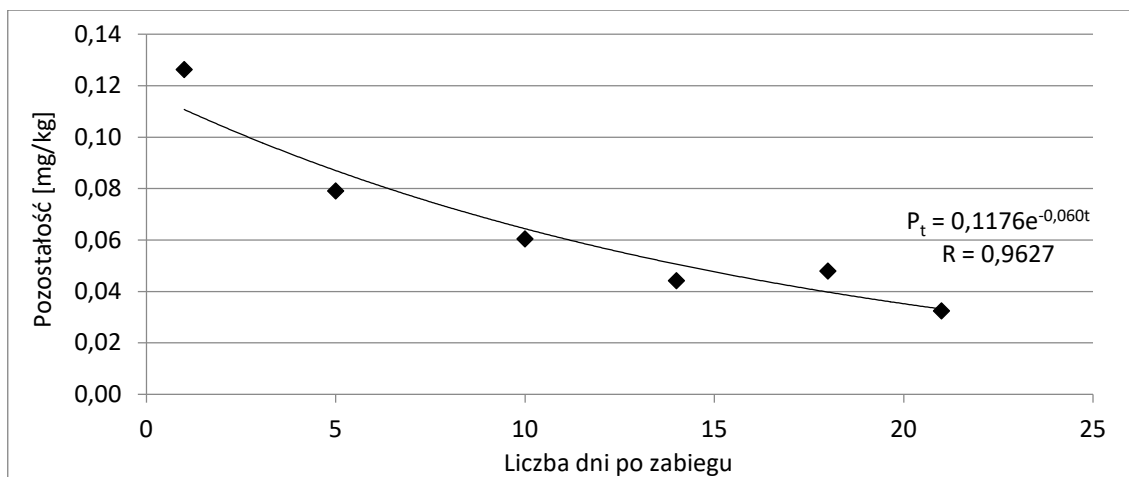
Rysunek 38. Pozostałości boskalidu po aplikacji preparatów: Bellis 38 WG 23.09.2016 i Zumba Plant® 29.09.2016

Pyraklostrobina

Pozostałości pyraklostrobiny w próbkach jabłek w pierwszym dniu po zabiegu preparatem chemicznym wyniosły $0,126 \pm 0,075$ mg/kg (Tab. 28), a następnie obniżały się zgodnie z równaniem wykładniczym $P_t = 0,1176e^{-0,060t}$ ($R = 0,9627$) (Rys. 39). Czas połowicznego zaniku wyniósł 11,5 dnia. Bezpośrednio przed zbiorem owoców, 21 dnia po zabiegu, pozostałości pyraklostrobiny wyniosły $0,032 \pm 0,003$ mg/kg. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 28.

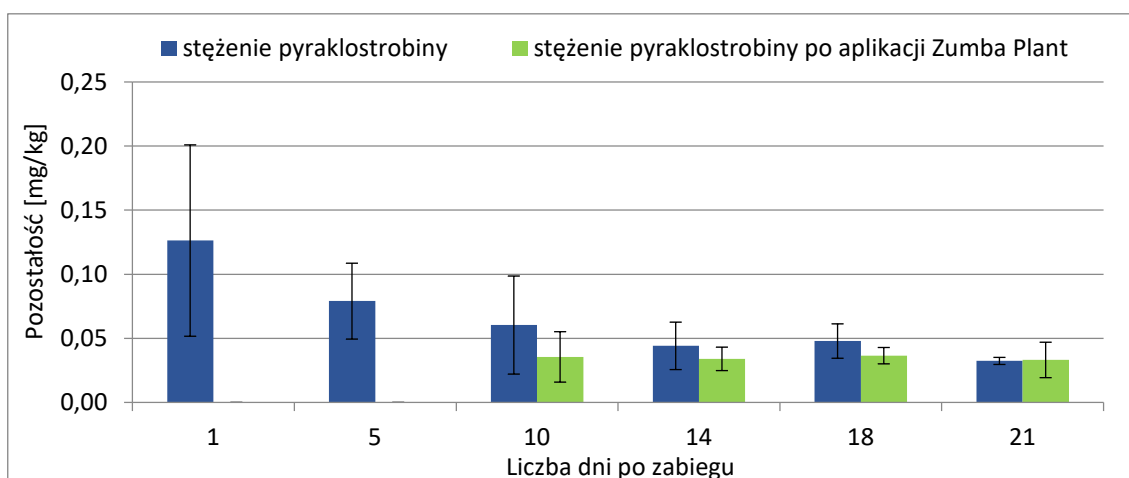
Tabela 28. Terminy pobierania próbek i poziomy pozostałości pyraklostrobiny po zabiegach: 23.09.2016 preparatem Bellis 38 WG i 29.09.2016 preparatem Zumba Plant® na odmianie Gloster

Data poboru próbek	Liczba dni po zabiegu preparatem chemicznym	Stężenie pyraklostrobiny [mg/kg]	SD [mg/kg]	Stężenie pyraklostrobiny po zabiegu preparatem biologicznym [mg/kg]	SD [mg/kg]
24.09.2016	1	0,126	0,075	–	–
28.09.2016	5	0,079	0,030	–	–
03.10.2016	10	0,060	0,038	0,036	0,020
07.10.2016	14	0,044	0,019	0,034	0,009
11.10.2016	18	0,048	0,013	0,037	0,006
14.10.2016	21	0,032	0,003	0,033	0,014



Rysunek 39. Krzywa zanikania pyraklostrobiny po zabiegu preparatem Bellis 38 WG – 24.09.2016 na odmianie Gloster

Po aplikacji preparatu biologicznego Zumba Plant® 29 września 2016 pozostałości pyraklostrobiny wyniosły $0,036 \pm 0,020$ mg/kg, i były niższe o 41% w stosunku do próbek kontrolnych (Tab. 28, Rys. 40). W kolejnych terminach (14 i 18 dnia po zabiegu) pozostałości były niższe o 24% i 37% w odniesieniu do prób kontrolnych (Rys. 40). W dniu zbioru pozostałości wyniosły $0,033 \pm 0,014$ mg/kg, podobnie jak w próbkach kontrolnych (Tab. 28).



Rysunek 40. Pozostałości pyraklostrobiny po aplikacji preparatów: Bellis 38 WG 23.09.2016 i Zumba Plant® 29.09.2016

Wyniki badań z powyższego doświadczenia zawarto w publikacji Podbielska i in. (2018).

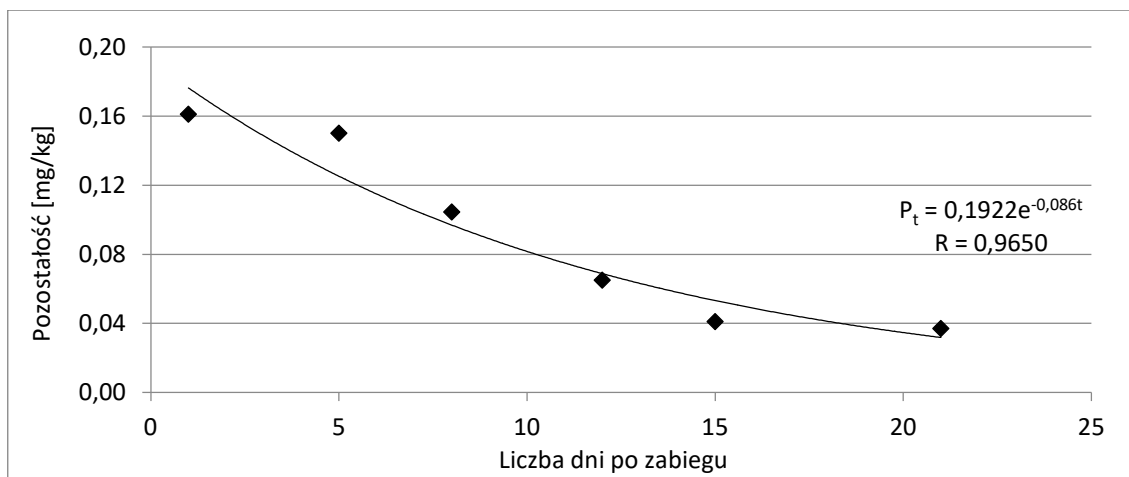
4.3.2 Doświadczenie 2

Zabieg na odmianie Gala w sadzie w Józefowie nad Wisłą wykonano preparatem chemicznym Fontelis 200 SC zawierającym 200 g/l substancji czynnej pentiopiradu, w dawce 0,75 l/ha. Aplikację przeprowadzono w całej kwaterze w dniu 16 sierpnia 2017. Następnego dnia (12 godzin po wykonanym zabiegu) rozpoczęto pobieranie próbek (17.08.2017) i kontynuowano: 21, 24, 28 i 31 sierpnia oraz 6 września. 23 sierpnia 2017 w bloku II (Rys. 13) przeprowadzono zabieg preparatem biologicznym Zumba Plant®. Próbki po aplikacji preparatu biologicznego oraz próbki stanowiące kontrolę pobrano następnego dnia po wykonanym zabiegu oraz 28, 31 sierpnia, i 6 września 2017 roku.

Pozostałości pentiopiradu w owocach w kolejnym dniu po wykonaniu zabiegu preparatem chemicznym wyniosły $0,161 \pm 0,034$ mg/kg (Tab. 29). Kinetykę zanikania badanej substancji czynnej określono równaniem wykładniczym: $P_t = 0,1922e^{-0,086t}$ ($R = 0,9650$), czas połowicznego zanikania wyniósł 8 dni (Rys. 41). Po 21 dniach od wykonania zabiegu, czyli w dniu zbioru owoców, zawartość pentiopiradu w jabłkach wyniosła $0,037 \pm 0,014$ mg/kg (Tab. 29).

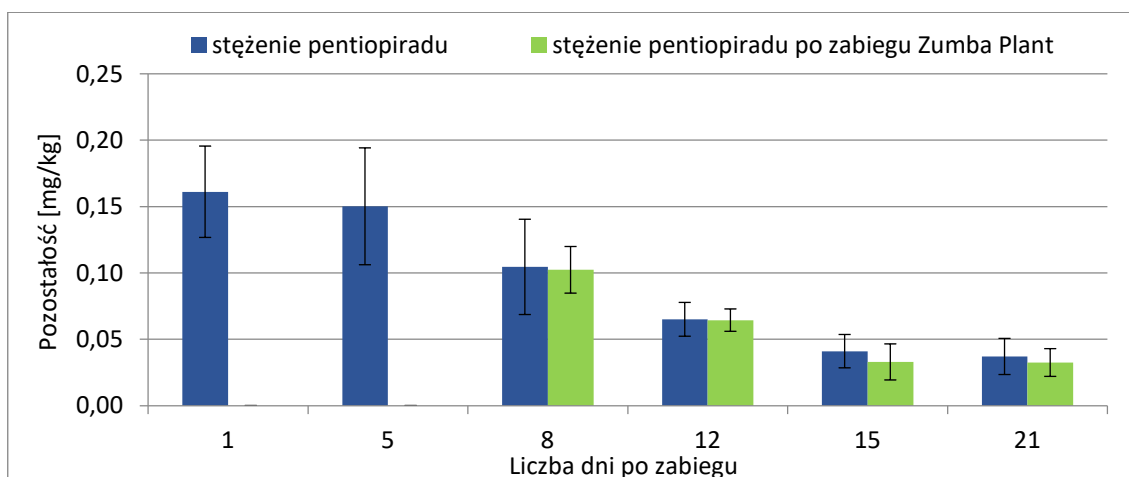
Tabela 29. Terminy pobierania próbek i poziomy pozostałości pentiopiradu po zabiegach: 16.08.2017 preparatem Fontelis 200 SC i 23.08.2017 preparatem Zumba Plant® na odmianie Gala

Data poboru próbek	Liczba dni po zabiegu preparatem chemicznym	Stężenie pentiopiradu [mg/kg]	SD [mg/kg]	Stężenie pentiopiradu po zabiegu preparatem biologicznym [mg/kg]	SD [mg/kg]
17.08.2017	1	0,161	0,034	–	–
21.08.2017	5	0,150	0,044	–	–
24.08.2017	8	0,105	0,036	0,102	0,018
28.08.2017	12	0,065	0,013	0,064	0,008
31.08.2017	15	0,041	0,013	0,033	0,014
06.09.2017	21	0,037	0,014	0,032	0,010



Rysunek 41. Krzywa zanikania pentiopyradu po zabiegu preparatem Fontelis 200 SC – 16.08.2017 na odmianie Gala

Preparat Zumba Plant® aplikowano 23 sierpnia 2017. Następnego dnia od wykonania zabiegu nie obserwowano zmian w zawartość pentiopyradu w jabłkach w odniesieniu do próbek kontrolnych, a pozostałości oznaczono na poziomie $0,102 \pm 0,018$ mg/kg (próbki kontrolne: $0,105 \pm 0,036$ mg/kg) (Tab. 29). W kolejnym terminie poboru próbek pozostałości osiągnęły taką samą wartość co w próbach kontrolnych. W trzecim i czwartym terminie poboru próbek po aplikacji preparatu biologicznego zaobserwowano obniżenie stężenia pentiopyradu w stosunku do próbek kontrolnych odpowiednio o 20% i 14% (Rys. 42).



Rysunek 42. Pozostałości pentiopyradu po aplikacji preparatów: Fontelis 200 SC 16.08.2017 Zumba Plant® 23.08.2017

4.3.3 Doświadczenie 3

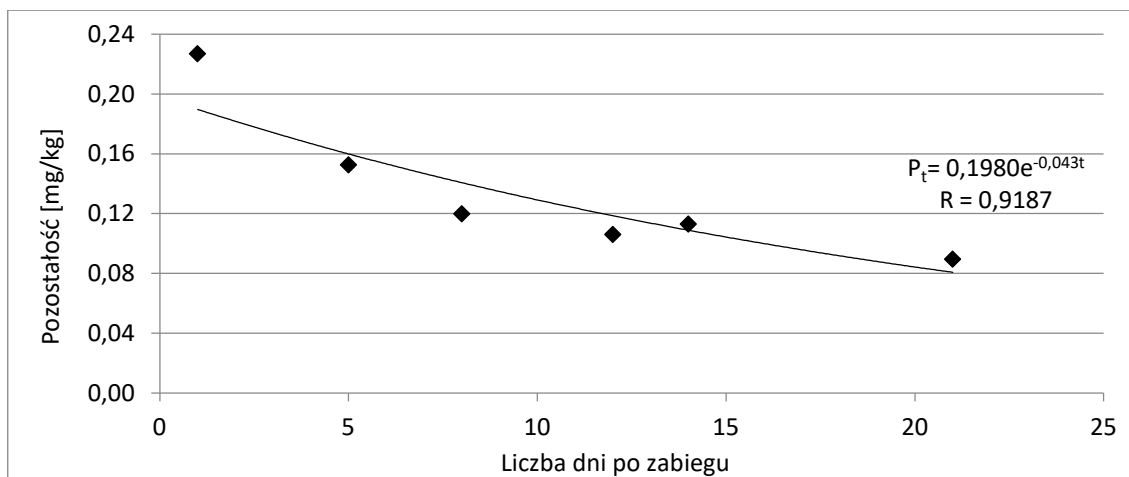
Doświadczenie rozpoczęto 23 sierpnia 2017 na odmianie jabłoni Red Jonaprince w Józefowie nad Wisłą. Zabieg wykonano preparatem chemicznym Luna Experience 400 SC w zalecanej dawce 0,75 l/ha zawierającym substancje czynne fluopyram i tebukonazol w ilości po 200 g/l każdej substancji. 12 godzin po wykonanym zabiegu (24.08.2017) rozpoczęto pobieranie próbek i kontynuowano w terminach 28, 31 sierpnia i 4, 7, 13 września. Aplikację preparatu biologicznego przeprowadzono 30 sierpnia w bloku II (Rys. 13). Próbki pobierano w czterech terminach 31 sierpnia, a także 4, 7 i 13 września.

Fluopyram

Pozostałości fluopyramu w pierwszym dniu po zastosowaniu preparatu Luna Experience 400 SC wyniosły $0,277 \pm 0,017$ mg/kg (Tab. 30). Pozostałości zanikały zgodnie z równaniem wykładniczym: $P_t = 0,1980e^{-0,043t}$ ($R = 0,9187$) (Rys. 43). Z równania obliczono czas połowicznego zaniku, który wyniósł 16,1 dnia. W chwili zbioru owoców pozostałości były na poziomie $0,090 \pm 0,018$ mg/kg (Tab. 30).

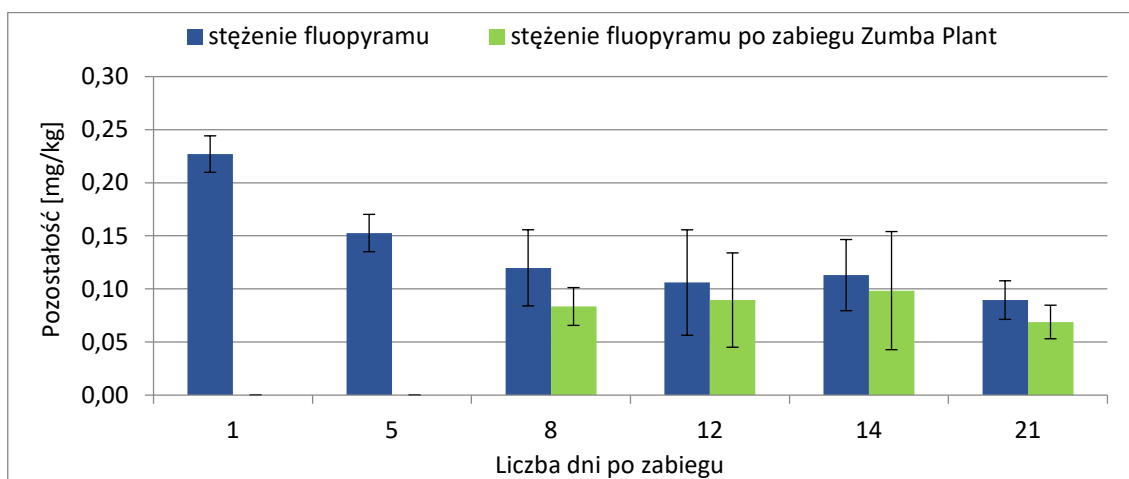
Tabela 30. Terminy pobierania próbek i poziomy pozostałości fluopyramu po zabiegach w dniu 23.08.2017 preparatem Luna Experience 400 SC i 30.08.2017 preparatem Zumba Plant® na odmianie Red Jonaprince

Data poboru próbek	Liczba dni po zabiegu preparatem chemicznym	Stężenie fluopyramu [mg/kg]	SD [mg/kg]	Stężenie fluopyramu po zabiegu preparatem biologicznym [mg/kg]	SD [mg/kg]
24.08.2017	1	0,227	0,017	–	–
28.08.2017	5	0,153	0,018	–	–
31.08.2017	8	0,120	0,036	0,083	0,018
04.09.2017	12	0,106	0,050	0,090	0,044
07.09.2017	14	0,113	0,034	0,098	0,056
13.09.2017	21	0,090	0,018	0,069	0,016



Rysunek 43. Krzywa zanikania fluopyramu po zabiegu preparatem Luna Experience 400 SC – 23.08.2017 na odmianie Red Jonaprince

Po aplikacji preparatu biologicznego Zumba Plant® pozostałości fluopyramu obniżyły się o 31% osiągając poziom $0,083 \pm 0,018$ mg/kg (Tab. 30, Rys. 44). W kolejnych dwóch terminach poboru próbek, pozostałości obniżyły się o ok. 15% osiągając stężenie odpowiednio $0,090 \pm 0,044$ mg/kg i $0,098 \pm 0,056$ mg/kg (Tab. 30). W ostatnim terminie poboru pozostałości fluopyramu obniżyły się o 22% w porównaniu do próbek kontrolnych i wyniosły $0,069 \pm 0,016$ mg/kg (Tab. 30, Rys. 44).



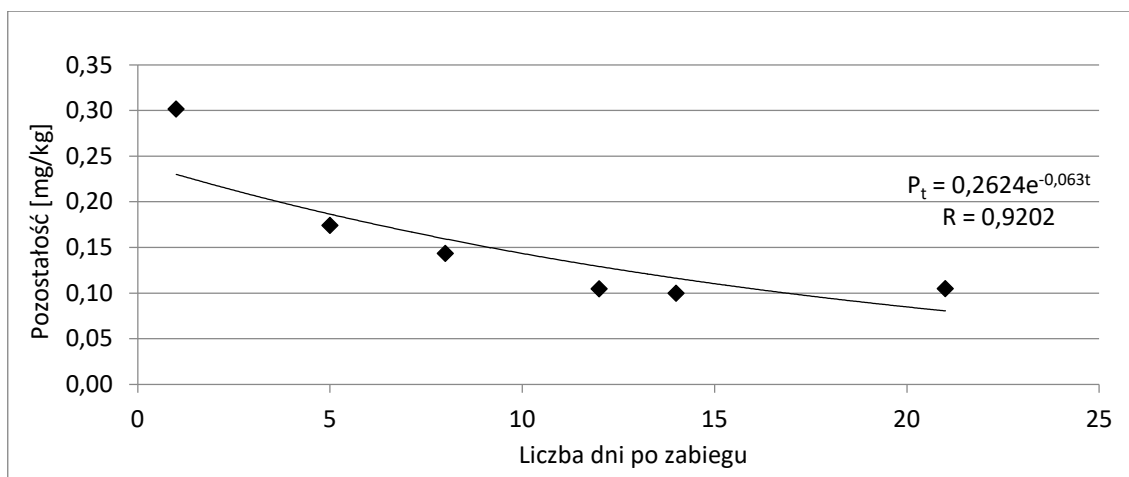
Rysunek 44. Pozostałości fluopyramu po aplikacji preparatów: Luna Experience 400 SC 23.08.2017 i Zumba Plant® 30.08.2017

Tebukonazol

Pozostałości tebukonazolu 12 godzin po wykonanym zabiegu były na poziomie $0,320 \pm 0,058$ mg/kg, natomiast w dniu zbioru owoców osiągnęły wartość $0,105 \pm 0,023$ mg/kg (Tab. 31). Obniżenie pozostałości badanej substancji czynnej następowało zgodnie z równaniem: $P_t = 0,2624e^{-0,063t}$ ($R = 0,9202$), obliczony czas połowicznego zaniku wyniósł 11 dni (Rys. 45). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 31.

Tabela 31. Terminy pobierania próbek i poziomy pozostałości tebukonazolu po zabiegach 23.08.2017 preparatem Luna Experience 400 SC i 30.08.2017 preparatem Zumba Plant® na odmianie Red Jonaprince

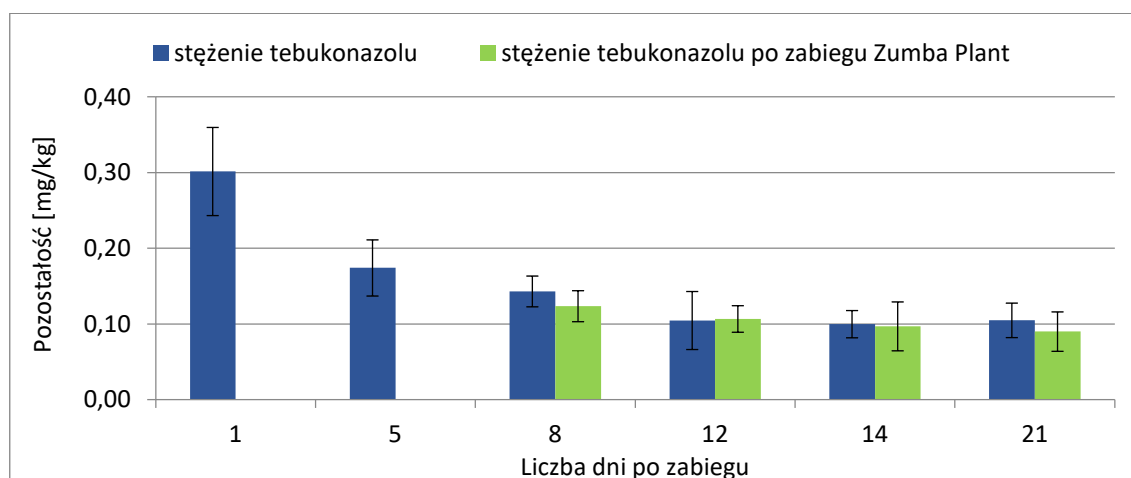
Data poboru próbek	Liczba dni po zabiegu	Stężenie tebukonazolu [mg/kg]	SD [mg/kg]	Stężenie tebukonazolu po zabiegu preparatem biologicznym [mg/kg]	SD [mg/kg]
24.08.2017	1	0,302	0,058	–	–
28.08.2017	5	0,174	0,037	–	–
31.08.2017	8	0,143	0,020	0,124	0,020
04.09.2017	12	0,105	0,038	0,107	0,018
07.09.2017	14	0,100	0,018	0,097	0,032
13.09.2017	21	0,105	0,023	0,090	0,026



Rysunek 45. Krzywa zanikania tebukonazolu po zabiegu preparatem Luna Experience 400 SC – 23.08.2017 i 30.08.2017 preparatem Zumba Plant® na odmianie Red Jonaprince

Pozostałości tebukonazolu w kolejnym dniu po aplikacji preparatu biologicznego Zumba Plant® wyniosły $0,124 \pm 0,020$ mg/kg (Tab. 31) i obniżyły się w stosunku do próbek kontrolnych o 12% (Rys. 46). W kolejnych dwóch terminach poboru prób tj. 4 i 7 września pozostałości zarówno w próbkach kontrolnych jak i tych z zaaplikowanymi mikroorganizmami były na

podobnym poziomie. W ostatnim terminie poboru próbek pozostałości wyniosły $0,090 \pm 0,026$ mg/kg i obniżyły się o 14% w stosunku do pozostałości w próbkach kontrolnych (Tab. 31, Rys. 46).



Rysunek 46. Pozostałości tebukonazolu po aplikacji preparatów: Luna Experience 400 SC 23.08.2017 i Zumba Plant® 30.08.2017

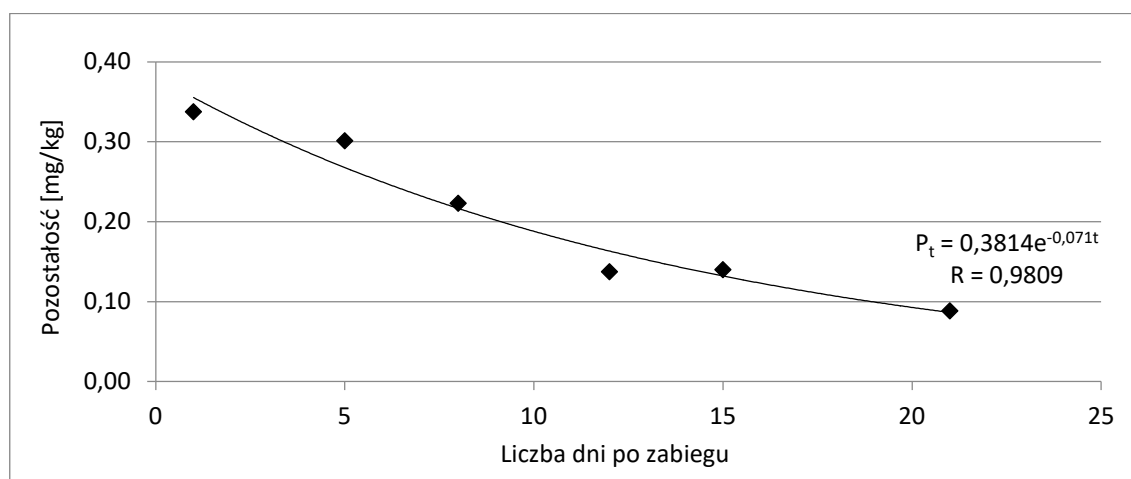
4.3.4 Doświadczenie 4

Doświadczenie przeprowadzono w sadzie w Rzeszowie na odmianie Boskoop. Zabieg preparatem Bellis 38 WG, zawierający w składzie boskalid (252 g/kg) i pyraklostrobinę (128 g/kg), wykonano 16 sierpnia 2018 w zalecanej dawce 0,8 kg/ha. Pierwsze próbki pobrano w kolejnym dniu po wykonanym zabiegu (12 godzin od aplikacji), a następnie 21, 24, 28, 31 sierpnia i 6 września. Zabieg preparatem biologicznym przeprowadzono w bloku II kwatery 23 sierpnia 2018 (Rys. 13). Probki pobierano następnego dnia po aplikacji oraz 28, 31 sierpnia i 6 września.

Boskalid

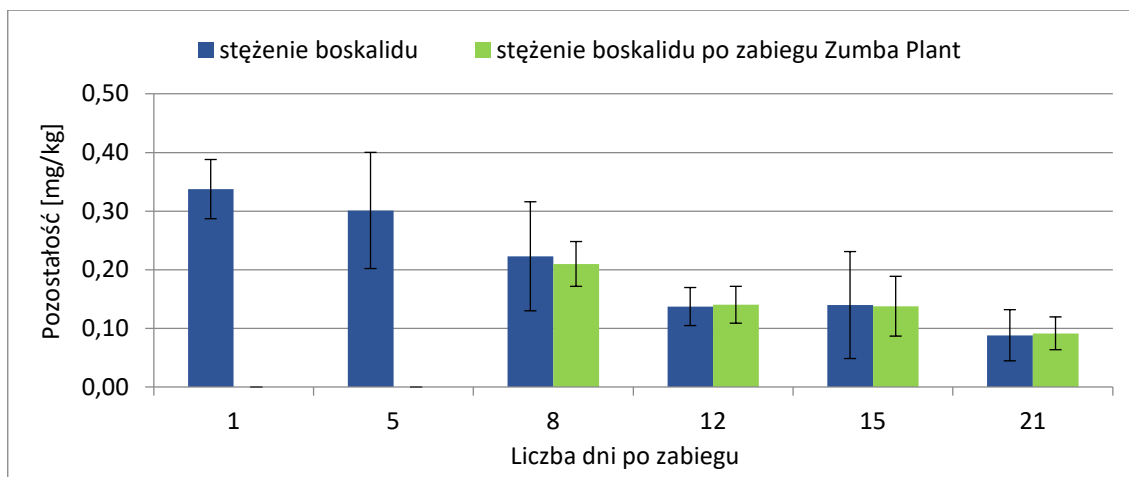
Początkowe pozostałości boskalidu były na poziomie $0,337 \pm 0,050$ mg/kg, a następnie zanikały zgodnie z równaniem wykładniczym $P_t = 0,3841e^{-0,071t}$ ($R = 0,9809$). Z równania wyznaczono czas połowicznego zaniku, który wyniósł 9,8 dnia (Rys. 47). 21 dni od przeprowadzonego zabiegu preparatem Bellis 38 WG pozostałości boskalidu wyniosły $0,088 \pm 0,044$ mg/kg (Tab. 32).

Data poboru próbek	Liczba dni po zabiegu preparatem chemicznym	Stężenie boskalidu [mg/kg]	SD [mg/kg]	Stężenie boskalidu po zabiegu preparatem biologicznym [mg/kg]	SD [mg/kg]
17.08.2018	1	0,337	0,050	–	–
21.08.2018	5	0,301	0,099	–	–
24.08.2018	8	0,223	0,093	0,210	0,038
28.08.2018	12	0,137	0,032	0,140	0,031
31.08.2018	15	0,140	0,091	0,138	0,051
06.09.2018	21	0,088	0,044	0,092	0,028



Rysunek 47. Krzywa zanikania boskalidu po zabiegu preparatem Bellis 38 WG – 16.08.2018 na odmianie Boskoop

Stężenie boskalidu w kolejnym dniu od zastosowania preparatu biologicznego wyniosło $0,210 \pm 0,038$ mg/kg i w porównaniu do próbek kontrolnych było niższe o 6% (Tab. 32, Rys. 48). W kolejnych trzech terminach poboru próbek pozostałości boskalidu były na zbliżonym poziomie co w próbkach kontrolnych (Tab. 32, Rys. 48).



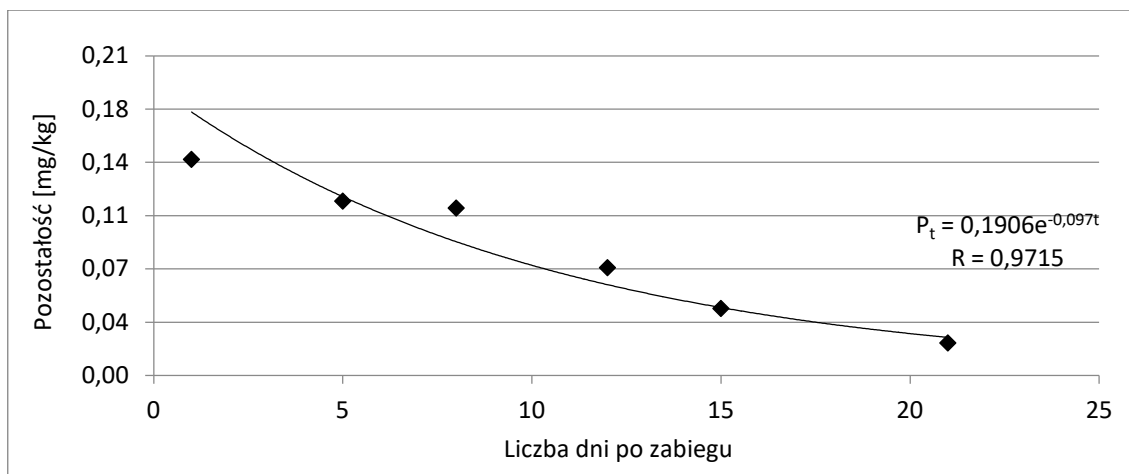
Rysunek 48. Pozostałości boskalidu po aplikacji preparatów: Bellis 38 WG 16.08.2018 i Zumba Plant® 23.08.2018

Pyraklostrobina

Pierwszego dnia po wykonaniu zabiegu pozostałości pyraklostrobiny w próbkach jabłek oznaczono na poziomie $0,142 \pm 0,055$ mg/kg (Tab. 33). W dniu zbioru owoców pozostałości badanej substancji czynnej oznaczono na poziomie $0,021 \pm 0,007$ mg/kg (Tab. 33). Z otrzymanych wyników wyznaczono równanie wykładnicze przedstawiające trend zanikania pyraklostrobiny w jabłkach: $P_t = 0,1906e^{-0,097t}$ ($R = 0,9715$) (Rys. 49). Czas połowicznego zaniku wyniósł 7 dni.

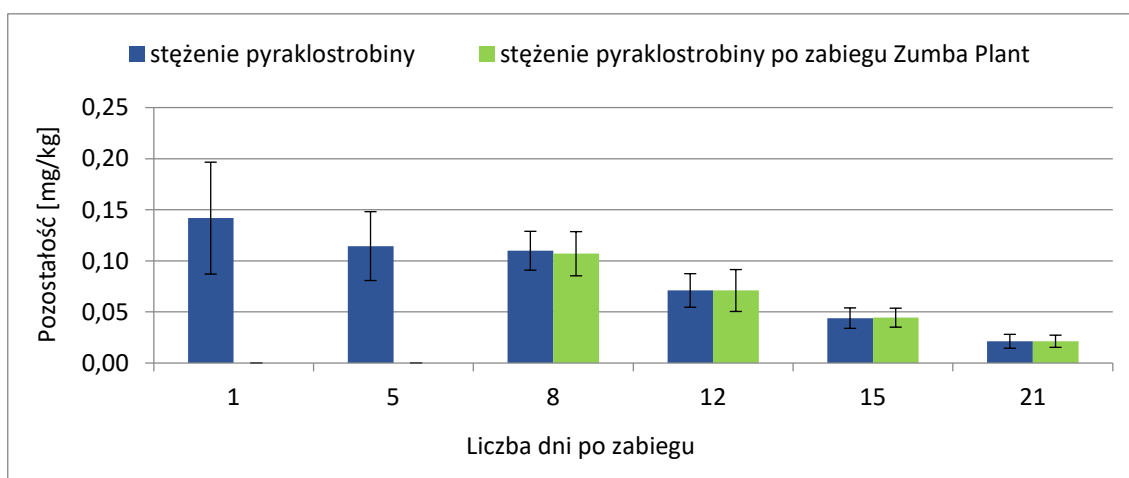
Tabela 33. Terminy pobierania próbek i poziomy pozostałości pyraklostrobiny po zabiegach: 16.08.2018 preparatem Bellis 38 WG i 23.08.2018 preparatem Zumba Plant® na odmianie Boskoop

Data poboru próbek	Liczba dni po zabiegu preparatem chemicznym	Stężenie pyraklostrobiny [mg/kg]	SD [mg/kg]	Stężenie pyraklostrobiny po zabiegu preparatem biologicznym [mg/kg]	SD [mg/kg]
17.08.2018	1	0,142	0,055	–	–
21.08.2018	5	0,115	0,034	–	–
24.08.2018	8	0,110	0,019	0,107	0,022
28.08.2018	12	0,071	0,016	0,071	0,021
31.08.2018	15	0,044	0,010	0,044	0,009
06.09.2018	21	0,021	0,007	0,021	0,006



Rysunek 49. Krzywa zanikania pyraklostrobiny po zabiegu preparatem Bellis 38 WG – 16.08.2018 na odmianie Boskoop

W przypadku zabiegu preparatem biologicznym na odmianie Boskoop pozostałości pyraklostrobiny w pierwszym terminie poboru (24.08.2018) były o 3% niższe w porównaniu do próbek kontrolnych. W drugim (28.08.2018), trzecim (31.08.2018) i czwartym (06.09.2018) terminie poboru próbek, pozostałości były na takim samym poziomie, co w próbkach kontrolnych (Tab. 33, Rys. 50).



Rysunek 50. Pozostałości pyraklostrobiny po aplikacji preparatów: Bellis 38 WG 16.08.2018 i Zumba Plant® 23.08.2018

4.3.5 Doświadczenie 5

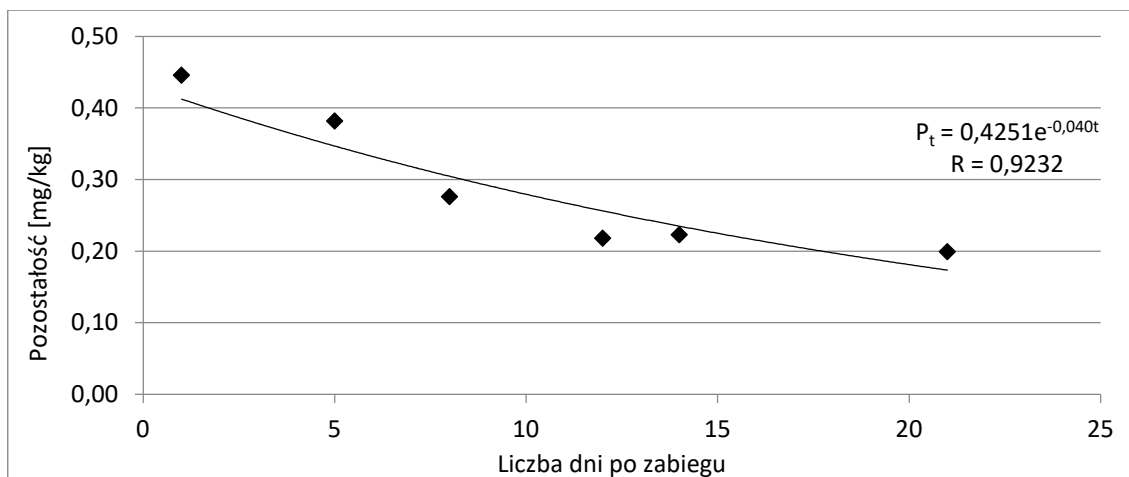
Zabieg preparatem chemicznym Luna Experience 400 SC (fluopyram – 200 g/l i tebukonazol – 200 g/l), w zalecanej dawce 0,75 l/ha, przeprowadzono 28.08.2018 na odmianie jabłoni Gala w sadzie zlokalizowanym w Rzeszowie. Następnego dnia po wykonaniu zabiegu (29.08.2018), rozpoczęto pobieranie próbek. Kolejne próbki pobierano w terminach: 2, 5, 9, 11 i 18 września. Preparat biologiczny zastosowano 4 września w bloku II (Rys. 13), próbki pobrano dzień później, a następnie 9, 11 i 18 września.

Fluopyram

Stężenie fluopyramu w jabłkach następnego dnia po wykonaniu zabiegu preparatem chemicznym wyniosło $0,446 \pm 0,162$ mg/kg (Tab. 34). W momencie zbioru owoców pozostałości były na poziomie $0,199 \pm 0,040$ mg/kg (Tab. 34). Kinetykę zanikania fluopyramu określało równanie wykładnicze: $P_t = 0,4251e^{-0,040t}$ ($R = 0,9232$) (Rys. 51). Z równania wyznaczono czas połowicznego zanikania, który wyniósł 17,3 dnia.

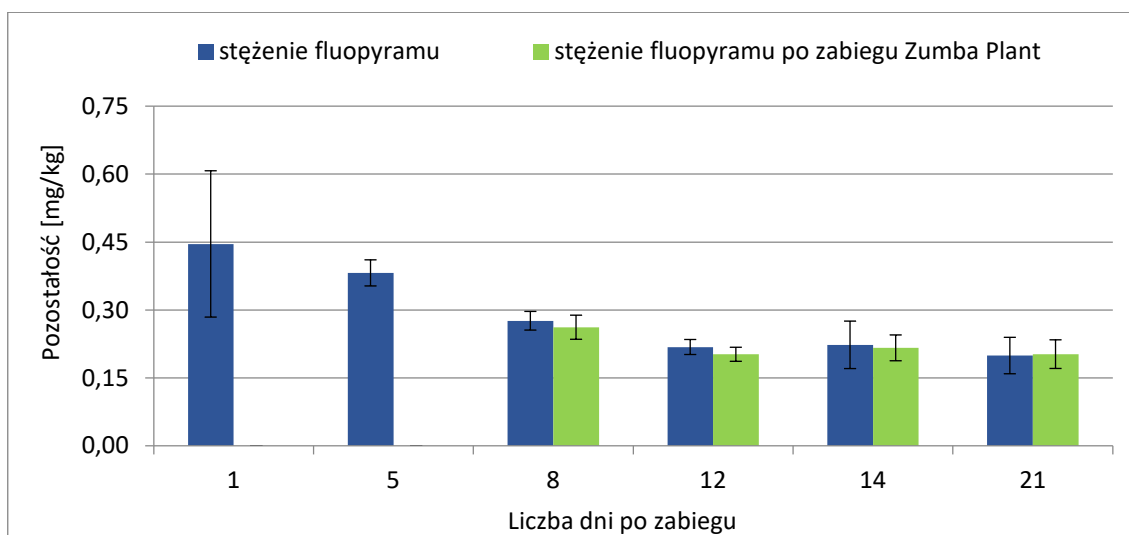
Tabela 34. Terminy pobierania próbek i poziomy pozostałości fluopyramu po zabiegach: 28.08.2018 preparatem Luna Experience 400 SC i 04.09.2018 preparatem Zumba Plant® na odmianie Gala

Data poboru próbek	Liczba dni po zabiegu preparatem chemicznym	Stężenie fluopyramu [mg/kg]	SD [mg/kg]	Stężenie fluopyramu po zabiegu preparatem biologicznym [mg/kg]	SD [mg/kg]
29.08.2018	1	0,446	0,162	–	–
02.09.2018	5	0,382	0,029	–	–
05.09.2018	8	0,276	0,021	0,262	0,027
09.09.2018	12	0,218	0,017	0,202	0,016
11.09.2018	14	0,223	0,052	0,216	0,028
18.09.2018	21	0,199	0,040	0,202	0,032



Rysunek 51. Krzywa zanikania fluopyramu po zabiegu preparatem Luna Experience 400 SC – 28.08.2018 na odmianie Gala

Pozostałości fluopyramu po aplikacji preparatu biologicznego w pierwszym terminie poboru próbek były na poziomie $0,262 \pm 0,027$ mg/kg i były niższe od pozostałości w próbkach kontrolnych o 5% (Tab. 34, Rys. 52). Pozostałości w drugim terminie poboru próbek były na poziomie $0,202 \pm 0,016$ mg/kg, w odniesieniu do próbek kontrolnych były niższe o 7% (Rys. 52). W trzecim terminie pozostałości były niższe tylko o 3%, natomiast w czwartym były niemal na takim samym poziomie co w próbkach kontrolnych (Rys. 52).



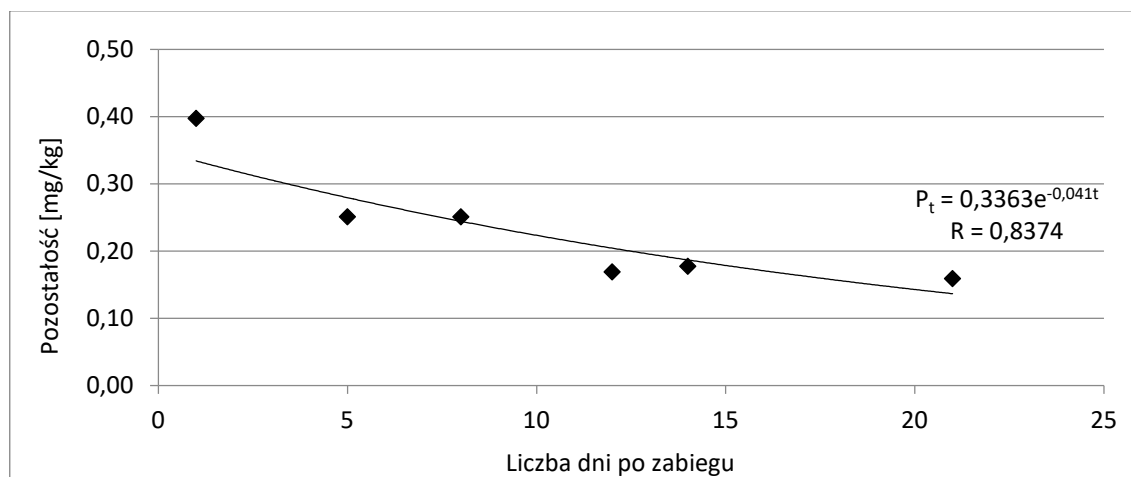
Rysunek 52. Pozostałości fluopyramu po aplikacji preparatów: Luna Experience 28.08.2018 i Zumba Plant® 04.09.2018

Tebukonazol

Pozostałości tebukonazolu w jabłkach następnego dnia od wykonania zabiegu preparatem chemicznym były na poziomie $0,397 \pm 0,110$ mg/kg. 21 dni po wykonaniu zabiegu, pozostałości były na poziomie $0,159 \pm 0,027$ mg/kg (Tab. 35). Przebieg zmian opisano równaniem wykładniczym $P_t = 0,3363e^{-0,041t}$ ($R = 0,8374$) (Rys. 53). Czas połowicznego zaniku wyniósł 16,9 dnia.

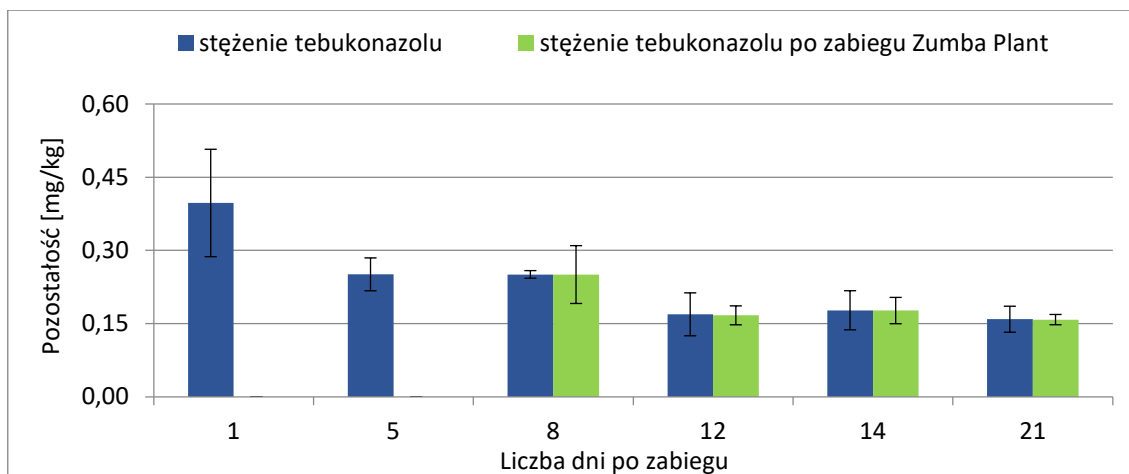
Tabela 35. Terminy pobierania próbek i poziomy pozostałości tebukonazolu po zabiegach: 28.08.2018 preparatem Luna Experience 400 SC i 04.09.2018 preparatem Zumba Plant® na odmianie Gala

Data poboru próbek	Liczba dni po zabiegu preparatem chemicznym	Stężenie tebukonazolu [mg/kg]	SD [mg/kg]	Stężenie tebukonazolu po zabiegu preparatem biologicznym [mg/kg]	SD [mg/kg]
29.08.2018	1	0,397	0,110	–	–
02.09.2018	5	0,251	0,034	–	–
05.09.2018	8	0,251	0,008	0,250	0,059
09.09.2018	12	0,169	0,044	0,167	0,019
11.09.2018	14	0,177	0,040	0,177	0,027
18.09.2018	21	0,159	0,027	0,158	0,011



Rysunek 53. Krzywa zanikania tebukonazolu po zabiegu preparatem Luna Experience 400 SC – 28.08.2018 na odmianie Gala

Po aplikacji preparatu biologicznego Zumba Plant® we wszystkich terminach poboru pozostałości tebukonazolu były o ok. 0,5% niższe w odniesieniu do próbek kontrolnych (Rys. 54).



Rysunek 54. Pozostałości tebukonazolu po aplikacji preparatów Luna Experience 400 SC 28.08.2018 i Zumba Plant® 04.09.2018

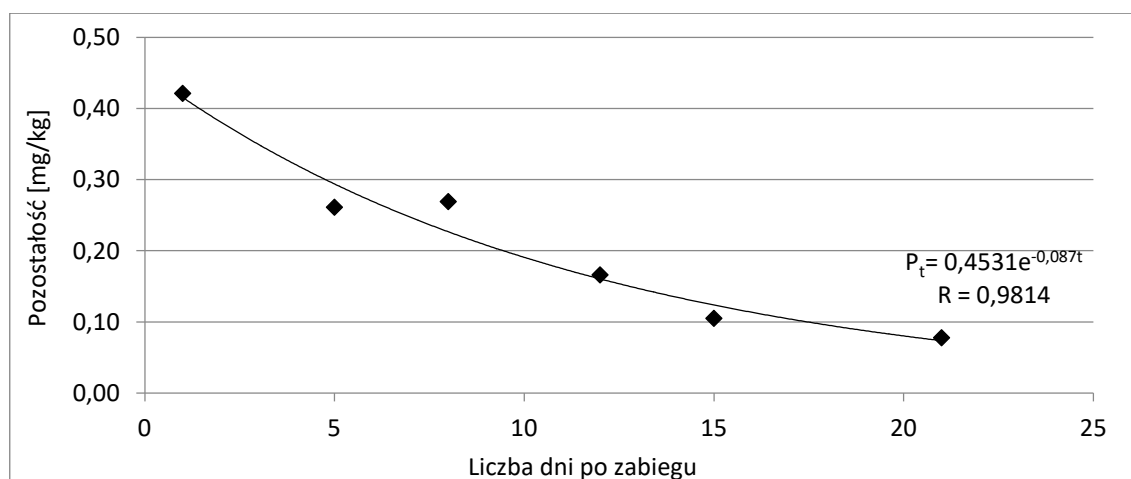
4.3.6 Doświadczenie 6

Zabieg preparatem Fontelis 200 SC (substancja czynna: pentiopirad 200 g/l) przeprowadzono na odmianie jabłoni Golden Delicious w dniu 4 września 2018. Preparat zastosowano zgodnie z etykietą w dawce 0,75 l/ha. Próbkę do badań pobierano następnego dnia (12 godzin) po zabiegu, a następnie 9, 12, 16, 19 i 25 września. Zabieg preparatem biologicznym Zumba Plant® wykonano 11 września, następnego dnia pobrano pierwsze próbki i kontynuowano 16, 19 i 25 września.

Pozostałości pentiopiradu w próbkach jabłek pierwszy dzień po zabiegu były na poziomie $0,421 \pm 0,046$ mg/kg i obniżyły się do poziomu $0,078 \pm 0,021$ mg/kg po 21 dniach trwania doświadczenia (Tab. 36). Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczono krzywą zanikania, którą opisano równaniem wykładniczym: $P_t = 0,4531e^{-0,087t}$ ($R = 0,9814$) (Rys. 55). Z równania wyznaczono czas połowicznego zaniku wynoszący 8 dni.

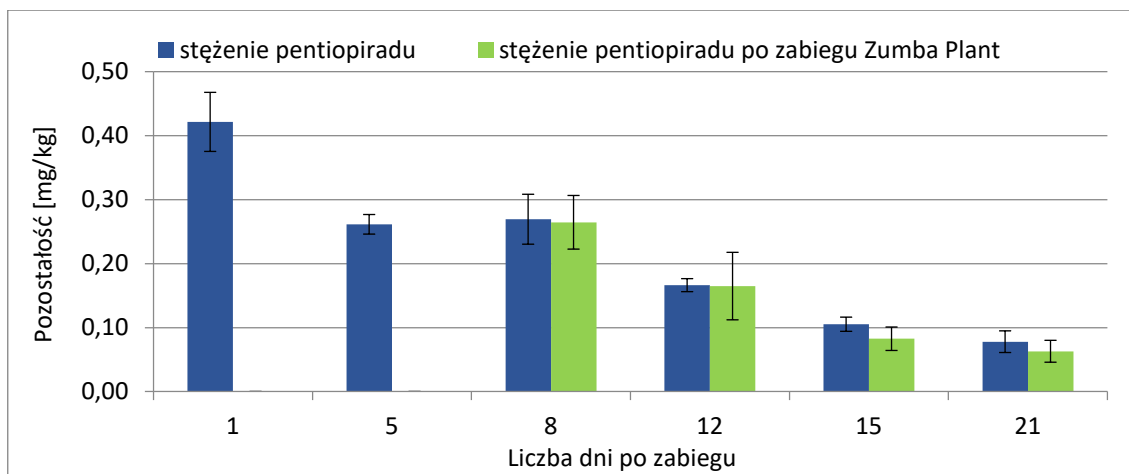
Tabela 36. Terminy pobierania próbek i poziomy pozostałości pentiopiradu po zabiegach: 04.09.2018 preparatem Fontelis 200 SC i 11.09.2018 preparatem Zumba Plant® na odmianie Golden Delicious

Data poboru próbek	Liczba dni po zabiegu preparatem chemicznym	Stężenie pentiopiradu [mg/kg]	SD [mg/kg]	Stężenie pentiopiradu po zabiegu preparatem biologicznym [mg/kg]	SD [mg/kg]
05.09.2018	1	0,421	0,046	–	–
09.09.2018	5	0,261	0,015	–	–
12.09.2018	8	0,269	0,039	0,265	0,042
16.09.2018	12	0,166	0,010	0,165	0,053
19.09.2018	15	0,105	0,011	0,083	0,018
25.09.2018	21	0,078	0,021	0,063	0,017



Rysunek 55. Krzywa zanikania pentiopiradu po zabiegu preparatem Fontelis 200 SC – 04.09.2018 na odmianie Golden Delicious

Po aplikacji preparatu biologicznego Zumba Plant® pozostałości pentiopiradu były na poziomie $0,265 \pm 0,042$ mg/kg i były niższe o 1,5% w odniesieniu do próbek kontrolnych (Tab. 36). Podobnie, w kolejnym terminie poboru, pozostałości były niższe tylko o 0,6% w stosunku do próbek kontrolnych (Rys. 56). 19 września pozostałości osiągnęły wartość $0,083 \pm 0,018$ mg/kg i uległy obniżeniu o 21% w porównaniu do kontroli (Tab. 36, Rys. 56). W ostatnim dniu doświadczenia pozostałości pentiopiradu były na poziomie $0,063 \pm 0,017$ mg/kg i obniżyły się o 19% w stosunku do próbek kontrolnych (Tab. 36, Rys. 56).



Rysunek 56. Pozostałości penthiopiradu po aplikacji preparatów Fontelis 200 SC 04.09.2018 preparatem i Zumba Plant® 11.09.2018

W doświadczeniach 1-6 różnice pomiędzy wynikami dla próbek badanych i kontrolnych nie były istotne statystycznie.

4.4 Zawartość mikotoksyn w próbkach jabłek

W żadnej z badanych próbek nie stwierdzono obecności patuliny, trichotecenów: deoksyniwalenolu, diacetoksyscirpenolu, HT-2 toksyny, T-2 toksyny, niwalenolu i zearalenonu, poniżej dolnych granic oznaczalności.

5. DYSKUSJA

Rozkład substancji czynnych pestycydów po zabiegu chemicznym jest istotny zarówno dla konsumenta, który oczekuje produktów o najwyższej jakości bez pozostałości pestycydów, a także producenta żywności, który wymaga, aby stosowane w ochronie upraw środki zapewniały skuteczną ochronę.

W przyrodzie istnieje duża liczba mikroorganizmów o silnych zdolnościach adaptacyjnych, które mogą wykorzystywać syntetyczne substancje organiczne, w tym pestycydy, jako źródło węgla, azotu i energii. Sprzyja to ich wzrostowi, a także może całkowicie mineralizować lub rozkładać takie substancje na małe nietoksyczne cząsteczki (Huang i in. 2018).

Zakres niniejszej pracy obejmował dwa główne aspekty (i) wyznaczenie w warunkach laboratoryjnych (*in vitro*) stopnia rozkładu wybranych substancji czynnych fungicydów przez szczepy bakterii *B. subtilis* i grzyba *T. harzianum* (aplikowanych pojedynczo oraz w mieszaninie); oraz (ii) sprawdzenie w warunkach polowych (*in vivo*) czy zalecane w Integrowanej Ochronie Roślin stosowanie preparatów biologicznych zawierających szczepy wyżej wymienionych bakterii i grzybów wpływają na rozkład substancji czynnych fungicydów. Badania polowe przeprowadzono w okresie 21 dni przed zbiorem owoców, czyli w okresie, gdy jabłka są zabezpieczane przed chorobami pochodzenia grzybowego przed włożeniem do chłodzi.

W doświadczeniach polowych zastosowano komercyjny preparat biologiczny Zumba Plant® zawierający szczepy antagonistycznych mikroorganizmów (*Bacillus* spp., *Trichoderma* spp.), grzybów mikoryzowych (*Glomus* spp.) oraz materię organiczną. Według producenta preparat ten posiada unikalny mechanizm działania (AKIO – wykorzystujący zjawiska antybiozy, konkurencji i indukcji odpornościowej) zwiększający odporność roślin na wiele chorobotwórczych drobnoustrojów, w tym na rasy odporne grzybów patogennych. Poprawia ogólną zdrowotność roślin poprzez zwiększenie ich naturalnej zdolności do zwalczania infekcji oraz podniesienie odporności na choroby (efekt szczepionki). Według etykiety szczepy *Bacillus* spp. zwiększają odporność roślin na szarą pleśń, antraknozę, skórzastą zgniliznę owoców truskawki i zgniliznę twardzikową, podnoszą jakość i zdolność przechowalniczą owoców i warzyw, wydłużają trwałość pozbiorczą owoców i warzyw oraz **zmniejszą obecność pozostałości środków ochrony roślin**. Szczepy grzybów *Trichoderma* spp. i *Glomus* spp. poprawiają ukorzenienie i stan odżywienia roślin poprzez zwiększenie pobierania składników pokarmowych, produkcję substancji stymulujących tj. hormonów, witamin, enzymów oraz redukcję i dezaktywację związków toksycznych lub hamujących rozwój systemu korzeniowego (Etykieta preparatu Zumba Plant®).

Przegląd literatury dotyczącej rozkładu pozostałości pestycydów wskazuje na brak danych (1 publikacja według baz: Scopus, Polska Bibliografia Naukowa, Web of Science) dotyczących wpływu mikroorganizmów aplikowanych w uprawach w warunkach polowych na poziomy pozostałości substancji czynnych. Dostępne dane literaturowe dotyczą głównie badań rozkładu tych związków w warunkach laboratoryjnych, w których m.in. mikroorganizmy izolowane z gleby są identyfikowane i testowana jest ich zdolność do degradacji wybranych substancji (Kaur i Balomajumder, 2019).

Przegląd literatury wskazuje na duże zainteresowanie wykorzystania biologicznych sposobów degradacji substancji czynnych, w tym organizmów bakteryjnych i grzybowych w warunkach laboratoryjnych. Dotyczą one głównie substancji czynnych insektycydów. Bakterie z gatunku *Bacillus* spp. rozkładają m.in. chloropiryfos (Anwar i in. 2009, Bhuimbar i in. 2011, Liu i in. 2012, Sasikala i in. 2012, Zhu i in. 2010), aldrynę, endrynę, DDT (Ferguson i Korte 1977, Patil i in. 1970, Sariwati i in. 2017), diazynon (Tamer i El-Naggar 2013), dieldrynę (Matsumura i Boush 1967), endosulfan (Awasthi 1999, Mohanasrinivasan i in. 2013), paration metylowy (Sharmila i in. 1989), paration (Nelson i in. 1982, Siddaramappa i in. 1973), metrybuzynę (Zhang i in. 2014), malation (Aziz i in. 2014, Kumari i in. 2012, Singh i in. 2009), cypermetrynę (Gangola i in. 2018) i kwinalfos (Gangireddygar i in. 2017). Z kolei *Trichoderma* spp. degradowuje: chloropiryfos (Harish i in. 2013, Jayaraman i in. 2014), DDT (Matsumura i Boush 1968, Patil i in. 1970), endrynę (Patil i in. 1970), endosulfan i parathion metylowy (Katayama i Matsumura 1993, Senthilkumar i in. 2011).

Wśród fungicydów poddawanych degradacji przez szczepy *Bacillus* spp. i *Trichoderma* spp. najwięcej publikacji dotyczy substancji z grupy benzimidazoli charakteryzujących się innym mechanizmem działania niż fungicydy będące przedmiotem niniejszej pracy. Zhang i in. (2009a) podają, że stopień degradacji karbendazymu przez *B. pumilus* NY97-1 w stężeniach: 10, 30, 50, 100, 300 mg/l wyniósł odpowiednio 42,44%, 48,97%, 77,19%, 78,66% i 90,07%. Salunkhe i in. (2014) podają, że degradacja karbendazymu przez cztery szczepy *B. subtilis* TL-171, TS-204, DR-39 i CS-126 była w zakresie 75,7-95,2%. Stopień degradacji wynoszący 73,2% otrzymali również Panda i in. (2018) dla bakterii *B. licheniformis* JTC-3. Sharma i in. (2016) określili procentową biodegradację karbendazymu dla *T. harzianum* 85%, *T. viride* 47%, a dla *T. atroviride* 21%. Z kolei Cycoń i in. (2011) przeprowadzili badania degradacji tiofanatu metylu przez *Bacillus* sp. TDS-2 określając jego stopień rozkładu na poziomie 77%.

Fungicydy mogą być degradowane również przez inne grupy mikroorganizmów (Osman 2006, Satapute i Kaliwal 2016, Sherif i in. 2011).

Duże jest także zainteresowanie naukowców badaniami zmian stężenia pozostałości pestycydów po aplikacji środków ochrony roślin. Ze względu na fakt, że wykorzystane w niniejszej

pracy preparaty chemiczne są stosunkowo niedawno wprowadzone na rynek, niewiele jest danych literaturowych dotyczących ich rozkładu. W celu uzupełnienia wiedzy o zachowaniu się substancji czynnych będących przedmiotem niniejszej pracy, zdecydowano się również na wyznaczanie kinetyk ich zanikania.

Badania nad wpływem mikroorganizmów na degradację: fluopyramu, tebukonazolu, boskalidu, pyraklostrobiny i pentiopiradu przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych *in vitro* oraz polowych *in vivo*. Do badań *in vitro* wybrano referencyjne szczepy bakterii *B. subtilis* PCM 486 oraz szczepy grzyba *T. harzianum* KKP 534, jako szczepy potencjalnie degradujące pestycydy, gdyż producent preparatu biologicznego wykorzystywanego w doświadczeniach polowych, podaje w etykiecie tylko wykorzystywane rodzaje mikroorganizmów, bez ich specyfikacji.

Fluopyram i tebukonazol

Fluopyram nie obniżał aktywności metabolicznej komórek bakterii *B. subtilis*. Niewielkie zahamowanie żywotności, w miarę postępowania czasu trwania doświadczenia wynikało z wyczerpywania się składników odżywczych i jednocześnie ze stopniowego gromadzenia się produktów metabolizmu (Rys. 21). Przeprowadzono również testy oceniające zdolność do wzrostu mikroorganizmów przy różnym zakresie stężeń fluopyramu. Nie obserwowano zahamowania wzrostu bakterii *B. subtilis* i grzyba *S. cerevisiae* w zakresie stężeń fluopyramu 0,02-1000 µg/ml (Rys. 22a i 25a). W badaniach laboratoryjnych rozkładu fluopyramu przez bakterie *B. subtilis* obserwowano niewielki stopień degradacji wynoszący od 2% – w 2 i 5 dniu do 10% – w 14 dniu trwania doświadczenia (Rys. 28a). W przypadku ekspozycji na grzyba *T. harzianum* stopień degradacji substancji czynnej wyniósł 74,3-81,7% (Rys. 31a), natomiast w przypadku badań z mieszaną kulturą bakterii i grzybów stopień degradacji był w zakresie od 8,3% w 5 dniu do 24,1% w 14 dniu trwania doświadczenia (Rys. 34a), co może świadczyć o inhibującym wpływie mikroorganizmów na siebie (Kim i in. 2008). Brak jest danych literaturowych dotyczących degradacji fluopyramu w warunkach laboratoryjnych, stąd trudno jest dokonać porównawczej oceny wskazującej na efektywność degradacji.

W badaniach żywotności komórek bakterii *B. subtilis* w obecności tebukonazolu obserwowano niską przeżywalność komórek (Rys. 21). W teście MIC po ekspozycji bakterii *B. subtilis* na działanie tebukonazolu obserwowano zahamowanie wzrostu komórek od stężenia substancji czynnej 20 µg/ml (Rys. 23b). W przeprowadzonym następnie teście MBC, bójczy wpływ na komórki bakterii obserwowano przy stężeniu substancji czynnej 100 µg/ml (Rys. 24b). W przypadku grzyba *S. cerevisiae* spadek absorbancji w teście MIC obserwowano już od stężenia 0,5 µg/ml. W teście MFC obserwowano bójczość badanej substancji czynnej w stężeniach 500

i 1000 µg/ml w stosunku do *S. cerevisiae* (Rys. 27). Wyniki tych testów potwierdzają badania degradacji. W doświadczeniu, w którym poddano rozkładowi tebukonazol przez bakterie stopień degradacji wyniósł zaledwie 0,2-0,5%, natomiast z wykorzystaniem grzybów 44,5-49,2% (Rys. 28b i 31b). Biorąc pod uwagę mieszaną kulturę bakterii i grzybów, podobnie jak w przypadku degradacji fluopyramu, również obserwowano inhibujący wpływ bakterii i grzybów na siebie. Stopień rozkładu wyniósł od 2,5% do 23,3% w 14 dniu trwania doświadczenia (Rys. 34b). Younes i in. (2018) podają, że gram-pozytywne bakterie *B. cereus* 2B9 i *Bacillus* sp. IB13 degradują tebukonazol o 30%, *Nocardia asteroides* LAB 911 o 35%, a *Bacillus* sp. 29B3 i *Bacillus* sp. 3B6 o 50%, natomiast gram-negatywne bakterie *Pseudomonas* sp. C12B ATCC 43648 degradują tebukonazol o 50%. W przypadku degradacji przez bakterie *Serratia marcescens* B1 po zastosowaniu tebukonazolu w stężeniu 200 mg/l stopień degradacji wyniósł 94,05%, natomiast po zastosowaniu wyższego stężenia początkowego od 300 mg/l wskaźniki degradacji spadły wraz ze wzrostem stężenia tebukonazolu osiągając przy stężeniu 500 mg/l stopień degradacji 64,11% (Wang i in. 2018). W badaniach przeprowadzonych przez Obanda i in. (2008) tebukonazol uległ degradacji o 68% przez *T. harzianum* w ciągu 21 dni. Younes i in. (2018) podają, że tebukonazol nie ulega degradacji przez grzyby z rodzaju *Aspergillus niger* ATCC 9142, *Aureobasidium pullulans* G, *Geotrichum candidum* CBS 14488, natomiast drożdże *Candida parapsilosis* ATCC 2046 degradują tebukonazol o 16%.

Badania polowe przeprowadzono z wykorzystaniem preparatu Luna Experience 400 SC zawierającego substancje czynne fluopyram i tebukonazol w ilości po 200 g substancji czynnych/l. Badania przeprowadzono na dwóch odmianach jabłoni: Red Jonaprince (sad położony w Józefowie nad Wisłą i Gala (sad położony w Rzeszowie) w dwuletnim cyklu badań (rok 2017 i 2018). Aplikację preparatu Luna Experience 400 SC przeprowadzono w zalecanej dawce 0,75 l/ha. Luna Experience 400 SC jest preparatem o działaniu układowym, a więc mało wrażliwym na zmywanie, przeznaczonym do stosowania zapobiegawczego lub interwencyjnego przeciwko parchowi jabłoni oraz mączniakiem jabłoni. W przypadku chorób przechowalniczych, stosowany jest do ochrony owoców przed gorzką, brunatną i mokrą zgnilizną, parchem przechowalniczym i szarą pleśnią (Etykieta Luna Experience 400 SC).

Bezpośrednio po aplikacji preparatu w sadzie w Józefowie nad Wisłą pozostałości fluopyramu wynosiły $0,227 \pm 0,017$ mg/kg, a następnie zanikały zgodnie z równaniem wykładniczym $P_t = 0,1980e^{-0,043t}$ ($R = 0,9187$) (Tab. 30, Rys. 43). Początkowe poziomy pozostałości fluopyramu zmniejszyły się o połowę po 16,1 dnia. Z kolei po aplikacji preparatu w sadzie w Rzeszowie pozostałości fluopyramu wynosiły $0,446 \pm 0,162$ mg/kg i zanikały zgodnie z równaniem

wykładniczymi: $P_t = 0,4251e^{-0,040 t}$ ($R = 0,9232$), osiągając czas połowicznego zaniku po 17,3 dnia (Tab. 34, Rys. 51).

Po zabiegach preparatem biologicznym stopień rozkładu pozostałości w sadach wyglądał nieco inaczej – w sadzie w Józefowie początkowe pozostałości fluopyramu uległy rozkładowi o 31% w stosunku do kontroli, następnie o 15%, a w ostatnim terminie poboru o 22% (Rys. 44). Z kolei w sadzie w Rzeszowie początkowo stopień rozkładu fluopyramu był niewielki i wyniósł tylko 3% w odniesieniu do kontroli, a następnie w kolejnym terminie poboru wyniósł 7%. W trzecim terminie stopień rozkładu fluopyramu wyniósł tylko 3%, a w ostatnim nie obserwowano różnic w poziomach pozostałości w próbkach badanych i kontrolnych (Rys. 52). Niewątpliwie ważnym czynnikiem wpływającym na przeżywalności i aktywność bakterii i grzybów są warunki pogodowe. W pierwszym terminie poboru próbek w sadzie w Józefowie nad Wisłą, kiedy temperatura wynosiła ok. 25°C (co sprzyjało wzrostowi mikroorganizmów) oraz nie odnotowywano opadów deszczu bezpośrednio po aplikacji preparatu biologicznego następowała szybsza degradacja niż w 2 i 3 terminie poboru próbek, kiedy temperatura wynosiła ok. 15°C (Rys. 16). Z kolei w sadzie w Rzeszowie w pierwszym terminie poboru próbek stopień rozkładu fluopyramu wyniósł tylko 3%, co może być spowodowane opadem deszczu po zabiegu i częściowym zmyciem zaaplikowanego preparatu (Rys. 18). Obserwowany w późniejszym terminie niski stopień degradacji (7%), a w kolejnych brak degradacji potwierdza, że mikroorganizmów po zmyciu było na tyle mało (lub ich nie było), że degradacja fluopyramu nie następowała. W literaturze brak jest danych dotyczących rozkładu fluopyramu przez mikroorganizmy w uprawach polowych.

Otrzymane wyniki można porównać jedynie z poprzednimi badaniami dotyczącymi zanikania fluopyramu w jabłkach, gdyż brak jest badań dotyczących degradacji oraz kinetyki zanikania pozostałości w badanych owocach w warunkach polowych. Dla fluopyramu otrzymano czas połowicznego zanikania wynoszący 7,7 dnia (Podbielska i in. 2017). Otrzymane różnice można tłumaczyć warunkami pogodowymi w czasie trwania doświadczeń w latach 2017 i 2018, kiedy temperatury powietrza były o ok. 5°C niższe niż w 2016 roku, co miało wpływ na szybkość rozkładu badanej substancji.

Badania przeprowadzone przez Patela i in. (2016) na temat zachowania fluopyramu w cebuli wykazało, że czas połowicznego zanikania wyniósł odpowiednio 8,85 i 9,12 dnia dla dawki standardowej (75 g/ha) i podwójnej (150 g/ha). W papryce chili Saha i in. (2016) wykazali okres półtrwania odpowiednio 1,161 i 1,214 dnia dla dawki pojedynczej (100 g/ha) i podwójnej (200 g/ha). Dong i Hu (2014) wykazali, że okres półtrwania po aplikacji fluopyramu w uprawie arbuza wyniósł 6,48-6,60 dni.

Pozostałości tebukonazolu po aplikacji preparatu chemicznego w sadzie w Józefowie nad Wisłą, były na poziomie $0,320 \pm 0,058$ mg/kg, z kolei w sadzie w Rzeszowie wyniosły $0,397 \pm 0,110$ mg/kg. Wyznaczone kinetyki zanikania opisano równaniami wykładniczymi: $P_t = 0,2624e^{-0,063t}$ ($R = 0,9202$) i $P_t = 0,3363e^{-0,041t}$ ($R = 0,8374$) odpowiednio w sadzie w Józefowie i Rzeszowie (Tab. 31 i 35, Rys. 45 i 53). Obliczono również czas połowicznego zanikania tebukonazolu, który wyniósł 11 i 16,9 dnia.

Po aplikacji preparatu biologicznego Zumba Plant® na odmianie jabłoni Red Jonaprince stopień rozkładu tebukonazolu wyniósł 12%, natomiast w dwóch kolejnych terminach pozostałości były na takim samym poziomie w próbkach badanych jak i kontrolnych. W ostatnim terminie poboru próbek stopień rozkładu wyniósł 14% (Rys. 46). Degradacja tebukonazolu przebiegała podobnie jak w przypadku fluopyramu, co potwierdza, że warunki pogodowe mają istotny wpływ na rozkład substancji czynnych pestycydów przez mikroorganizmy. W odmianie jabłoni Gala nie obserwowano rozkładu pozostałości tebukonazolu po zastosowaniu preparatu biologicznego (Rys. 54). Po częściowym zmyciu mikroorganizmów tebukonazol mógł zadziałać inhibując na mikroorganizmy, które pozostały na roślinie i nie wykazywały one aktywności w rozkładzie pozostałości badanej substancji czynnej. Wang i in. (2018) podają, że po aplikacji szczepu bakterii *Serratia marcescens* B1 na tebukonazol zastosowany w badaniach polowych i szklarni w uprawie kapusty pekińskiej, czasy połowicznego zanikania zostały skrócone odpowiednio o 15,93% i 23,09%. Dane te korelują z wynikami degradacji otrzymanymi w odmianie Red Jonaprince.

W badaniach przeprowadzonych w 2016 wyznaczony czas połowicznego zanikania tebukonazolu wyniósł 7,9 dnia (Podbielska i in. 2017). Podobne badanie przeprowadzili Patyal i in. (2013), którzy podają, że wartości okresu półtrwania w jabłkach wahały się między 19,38-25,99 a 19,84-28,86 dni odpowiednio przy aplikacji w dawce 200 i 400 g substancji czynnej/ha. Patel i in. (2016) podają, że okres połowicznego zaniku w cebuli wynosił 6,69-7,72 dnia, natomiast Mohapatra i in. (2011) oraz Mohapatra (2014) wykazali czas połowicznego zanikania tebukonazolu w tym warzywie 1,7 dnia i 6 dni. W badaniach przeprowadzonych przez Saha i in. (2016), po zastosowaniu tebukonazolu w papryce chili w dawce pojedynczej (100 g/ha) i podwójnej (200 g/ha) czas połowicznego zanikania wyniósł od 0,866 do 1,083 dnia. Również Sahoo i in. (2012) otrzymali w tej samej uprawie czas połowicznego zanikania wynoszący 1 dzień. Mohapatra (2015) podaje wartość czasu połowicznego zanikania w mango 6 dni, w arbuzie 5,87-6,93 dni (Dong i Hu 2014), w żółtym 4,49 dnia (Wang i in. 2015b), 0,9 dnia w pomidorze (Singh i Singh 2014), 2,8 dnia w truskawkach (Wang i in. 2015a) oraz 11,97 dnia w pieprzu (Fenoll 2009).

Boskalid i pyraklostrobina

W przeprowadzonych badaniach laboratoryjnych oceny żywotności bakterii *B. subtilis* w obecności boskalidu obserwowano ich przeżywalność (Rys. 21). W testach MIC wobec bakterii *B. subtilis* i grzyba *S. cerevisiae* nie obserwowano zahamowania wzrostu mikroorganizmów w badanym zakresie stężeń boskalidu 0,02-1000 µg/ml (Rys. 22b i 25b). W badaniach laboratoryjnych rozkładu boskalidu przez bakterie *B. subtilis*, obserwowano niewielki stopień degradacji wynoszący 0,6-3,6% (Rys. 29a). W przypadku rozkładu przez grzyba *T. harzianum* stopień degradacji był w zakresie 79,6-82,5% (Rys. 32a), natomiast w badaniach degradacji boskalidu przez mieszaninę bakterii i grzybów stopień degradacji był w zakresie 64,7%-66,8% (Rys. 35a). Otrzymane wyniki również potwierdzają inhibujący wpływ mikroorganizmów na siebie. Wołejko i in. (2016) do degradacji boskalidu zastosowali efektywne mikroorganizmy: *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, i *Streptococcus lactis* (bakterie kwasu mlekowego), *Rhodopseudomonas palustris* i *Rhodobacter spaeroides* (bakterie fotosyntetyczne), *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida utilis* *Streptomyces albus* i *Streptomyces griseus* (promieniowce) oraz *Aspergillus oryzae*, *Penicillium sp.* i *Mucor hiemalis* (grzyby fermentujące). Badania przeprowadzono w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, w fitotronach, na roślinach sałaty. Po aplikacji 1% roztworu efektywnych mikroorganizmów boskalid uległ rozkładowi o 57,1%, natomiast po zastosowaniu 10% procentowego roztworu rozkład substancji czynnej był na podobnym poziomie wynoszącym 60%. Po zastosowaniu mieszaniny 10% roztworu efektywnych mikroorganizmów i drożdży stwierdzono rozkład boskalidu o 45,4%.

Po ekspozycji bakterii *B. subtilis* na działanie pyraklostrobiny obserwowano niewielki spadek absorbancji przy stężeniu substancji czynnej 5 µg/ml (Rys. 23a), co może świadczyć o hamowaniu wzrostu. Jednak w testach MBC nie obserwowano bójkowego wpływu stosowanej substancji na szczepy bakterii (Rys. 24a). Z kolei w przypadku *S. cerevisiae* nie obserwowano hamowania wzrostu przez pyraklostrobinę (Rys. 25c). W przypadku rozkładu pyraklostrobiny przez *B. subtilis* oznaczono stopień degradacji na poziomie ok. 4% (Rys. 29b). W badaniach degradacji pyraklostrobiny przez *T. harzianum* w piątym dniu trwania doświadczenia nastąpił rozkład substancji czynnej o 99% w stosunku do kontroli (Rys. 32b). W przypadku ekspozycji pyraklostrobiny wobec mieszanej kultury bakterii i grzybów, stopień rozkładu był w zakresie od 63,2% do 64,6% (Rys. 35b). Potwierdza to inhibujący wpływ bakterii i grzybów na siebie. W badaniach przeprowadzonych przez Wołejko i in. (2016) stopień rozkładu pyraklostrobiny po zastosowaniu 1% roztworu efektywnych mikroorganizmów na roślinach sałaty wyniósł 87,6%. Tak samo jak w przypadku boskalidu, stosując 10% roztwór mikroorganizmów nastąpiło obniżenie pozostałości pyraklostrobiny o ok. 60%. Aplikacja mieszanin 1% i 10% roztworu mikroorganizmów

z drożdżami obniżyła stężenie pyraklostrobiny odpowiednio o 67,58% i 81,3%. Z kolei Lopes i in. (2010) podają, że po zastosowaniu bakterii *Klebsiella* sp. pyraklostrobina uległa degradacji o 31,7%.

Doświadczenia polowe przeprowadzono z wykorzystaniem preparatu Bellis 38 WG zawierającym w składzie boskalid – 252 g/kg i pyraklostrobinę – 128 g/kg. Badania przeprowadzono w 2016 roku w sadzie w Józefowie nad Wisłą na odmianie jabłoni Gloster oraz w 2018 roku w sadzie w Rzeszowie na odmianie Boskoop. Fungicyd zastosowano w zalecanej dawce 0,8 kg/ha. Bellis 38 WG jest środkiem grzybobójczym o działaniu systemicznym do stosowania zapobiegawczego i interwencyjnego w ochronie jabłoni przeciwko gorzkiej zgniliznie jabłek (Etykieta Bellis 38 WG).

Po zastosowaniu preparatu Bellis 38 WG początkowe pozostałości boskalidu w jabłkach pobranych w sadzie w Józefowie nad Wisłą wyniosły $0,238 \pm 0,166$ mg/kg, natomiast w próbkach pobranych w sadzie w Rzeszowie $0,337 \pm 0,050$ mg/kg (Tab. 27, 32). Kinetykę zanikania boskalidu w jabłkach na odmianie Gloster opisano równaniem wykładniczym $P_t = 0,2824e^{-0,071t}$ ($R = 0,9323$), natomiast na odmianie Boskoop $P_t = 0,3814e^{-0,071t}$ ($R = 0,9809$) (Rys. 37, 47). Obliczony czas połowicznego zanikania w obydwu odmianach wyniósł 9,7 dnia.

Bezpośrednio po aplikacji preparatu biologicznego na odmianie Gloster stopień rozkładu boskalidu wyniósł 52%. W kolejnych terminach stopień rozkładu wyniósł 42% i 13%, natomiast w ostatnim dniu poboru próbek pozostałości osiągnęły niemal tę samą wartość, co w próbkach kontrolnych (Rys. 38). Otrzymany wysoki stopień rozkładu wynika z warunków pogodowych. W rozwoju grzybów antagonistycznych ważną rolę odgrywa temperatura, która determinuje aktywność grzyba. W czasie wykonywania zabiegu temperatura była w zakresie 12-24°C, co pozwoliło na duże namnożenie mikroorganizmów i dużą ich aktywność. Od 12 dnia temperatura obniżyła się do poziomu 2-13°C (Rys. 14). Podczas poboru próbek 14 dnia stwierdzono wysoki stopień rozkładu boskalidu, prawdopodobnie związany z tym, że mikroorganizmów było na tyle dużo, że nadal następowała jego degradacja. Zahamowanie degradacji widoczne było w 18 dniu poboru próbek gdzie stopień rozkładu wyniósł 13%, a w ostatnim terminie (21 dzień) mikroorganizmy nie wykazywały aktywności. W czasie trwania doświadczenia odnotowano niewielkie opady, które wpływały na wilgotność powietrza sprzyjającą wzrostowi grzybów. W odmianie Boskoop w pierwszym terminie poboru próbek pozostałości boskalidu uległy obniżeniu tylko o 6%. Z analizy warunków pogodowych wynika, że po zabiegu preparatem biologicznym odnotowano wysoką temperaturę ok. 30°C, w której zarodniki konidialne *Trichoderma* spp., ze względu na cienkie ściany mogły obumierać (Kosicka i in. 2014). Dodatkowo przed poborem próbek wystąpiły opady deszczu. Podobne warunki pogodowe i początkowy stopień rozkładu odnotowano dla rozkładu fluopyramu w odmianie Red Jonaprince. W kolejnych

terminach poboru próbek nie następował rozkład boskalidu (w odniesieniu do kontroli), prawdopodobnie spowodowany zmyciem mikroorganizmów z powierzchni owoców po opadach deszczu zarówno 7 jak i 10 dnia trwania doświadczenia (Rys. 17).

Porównując wyniki dotyczące czasu połowicznego zanikania boskalidu w jabłkach otrzymano podobne wartości do Piechowicza i in. (2016), którzy podają, że czas połowicznego zanikania tej substancji w dojrzałych jabłkach wynosi 8 dni. Podobny wynik dla czasu połowicznego zanikania boskalidu wynoszący 8 dni uzyskali Sadło i in. (2014) w malinach. Chen i Zhang (2010) podają czas połowicznego zanikania w zakresie 4,9-6,4 dni dla truskawek. W badaniach przeprowadzonych przez Jankowską i in. (2016) czas połowicznego zanikania boskalidu w pomidorach odmiany Marissa wyniósł 2,8 dnia, natomiast w odmianie Herzfeuer 3 dni.

Po aplikacji preparatu chemicznego, początkowe pozostałości pyraklostrobiny w jabłkach wyniosły $0,126 \pm 0,0075$ mg/kg – odmiana Gloster i $0,142 \pm 0,055$ mg/kg – odmiana Boskoop i zanikały zgodnie z równaniami wykładniczymi: $P_t = 0,1176e^{-0,060t}$ ($R = 0,9627$) i $P_t = 0,1906e^{-0,097t}$ ($R = 0,9715$) odpowiednio w odmianie Gloster i Boskoop (Tab. 28, 33, Rys. 39 i 49). Obliczony czas połowicznego zanikania pyraklostrobiny wyniósł 11,5 i 7 dni (odmiana Gloster i Boskoop).

Po zabiegu preparatem Zumba Plant® na odmianie jabłoni Gloster pozostałości pyraklostrobiny były niższe o 41% w stosunku do próbek kontrolnych, w kolejnych dniach poboru próbek stopień rozkładu wyniósł 24% i 37% (Rys. 40). W ostatnim terminie nie obserwowano rozkładu badanej substancji czynnej. Podobnie jak w przypadku boskalidu, istotnym czynnikiem wpływającym na taki rozkład były warunki pogodowe. Po aplikacji preparatu Zumba Plant® na odmianie Boskoop rozkład pyraklostrobiny następował analogicznie jak boskalidu. W pierwszym dniu pobierania próbek stopień rozkładu wyniósł 3%, natomiast w kolejnych dniach pozostałości były na takim samym poziomie, co w próbkach kontrolnych (Rys. 50). Uzyskane wyniki potwierdzają wpływ warunków pogodowych panujących w sadzie (temperatura i występowanie opadów) na aktywności i rozkład substancji czynnych przez mikroorganizmy (Rys. 14 i 17). W literaturze brak jest danych dotyczących rozkładu pyraklostrobiny przez mikroorganizmy w uprawach polowych.

Badania przeprowadzone przez innych autorów dotyczące zanikania pyraklostrobiny w dojrzałych jabłkach wykazały, że czas połowicznego zanikania wyniósł 8 dni (Piechowicz i in. 2016), natomiast w malinach 9 dni (Sadło i in. 2014), a w bananach od 5,25 do 9,90 dni (Yang i in. 2018). Badania wykazały, że pyraklostrobina zanika szybko w truskawkach – 1,69 dnia (Sun i in. 2015) oraz 3,7 dnia (Wang i in. 2015a) i 4,06 (Zhang i in. 2009a), a także w roślinie kukurydzy 1,6-1,7 dnia (You i in. 2012). W orzeszkach ziemnych czas połowicznego zanikania tej substancji wyniósł 10,3-11,2 dnia (Zhang i in. 2012).

Pentiopirad

W badaniach aktywności metabolicznej komórek bakterii *B. subtilis* w obecności pentiopiradu obserwowano przeżywalność komórek (Rys. 21). W testach MIC nie stwierdzono inhibicji wzrostu bakterii *B. subtilis* i grzyba *S. cerevisiae* przez pentiopirad w zakresie stężeń 0,02-1000 µg/ml. (Rys. 22c i 25d). W badaniach degradacji pentiopiradu przez bakterie *B. subtilis* stopień rozkładu substancji czynnej wyniósł 9,6% (Rys. 30), natomiast przez szczepy *T. harzianum* 34,2-56,9% (Rys. 33). Podobnie jak w przypadku pozostałych badanych substancji czynnych, po zastosowaniu mieszaniny bakterii i grzybów stopień rozkładu pentiopiradu był niższy niż po zastosowaniu szczepu grzyba pojedynczo i mieści się w zakresie 23,7-29,1% (Rys. 36). W literaturze brak jest danych dotyczących degradacji pentiopiradu w warunkach laboratoryjnych.

Zabiegi preparatem Fontelis 200 SC w dawce 0,75 l/ha, zawierającej 200 g/l substancji czynnej pentiopiradu przeprowadzono na odmianach jabłoni Gala – Józefów nad Wisłą (2017 rok) i Golden Delicious – Rzeszów (2018 rok). Fontelis 200 SC jest preparatem o działaniu kontaktowym, wgłębnym i lokalnie układowym do stosowania zapobiegawczego lub interwencyjnego, w ochronie jabłoni przeciwko parchowi i mączniakowi jabłoni (Etykieta Fontelis 200 SC).

Początkowe stężenia pentiopiradu w jabłkach wynosiły: w odmianie Gala $0,161 \pm 0,034$ mg/kg, a w odmianie Golden Delicious $0,421 \pm 0,046$ mg/kg (Tab. 29, 36). Wpływ na takie różnice może mieć także temperatura. W sadzie w Józefowie nad Wisłą temperatury były o ok. 5°C wyższe, co mogło wpłynąć na szybszy rozkład pentiopiradu i niższe pozostałości początkowe (Rys. 15 i 19). Niemniej jednak w równaniach kinetycznych dla reakcji I rzędu początkowe stężenie nie wpływa na czas połowicznego rozkładu. W obu odmianach jabłek wyznaczony czas połowicznego zanikania dla pentiopiradu wyniósł 8 dni. Przebieg zmian pozostałości pentiopiradu opisano równaniami kinetycznymi: $P_t = 0,1922e^{-0,086t}$ ($R = 0,9650$) i $P_t = 0,4531e^{-0,087t}$ ($R = 0,9814$) odpowiednio w odmianie Gala i Golden Delicious (Rys. 41 i 55).

Po zabiegu preparatem biologicznym rozkład pozostałości pentiopiradu w owocach w obu sadach przedstawiał się podobnie. W pierwszych dwóch terminach poboru próbek nie obserwowano degradacji pentiopiradu przez mikroorganizmy, natomiast 15 dnia doświadczenia nastąpił rozkład o ok. 20%, a w ostatnim dniu doświadczenia pozostałości uległy rozkładowi o 14% w odmianie Gala i 19 % w odmianie Golden Delicious (Rys. 42, 56). Warunki pogodowe panujące w trakcie trwania doświadczenia (temperatura 10-27°C i brak opadów po aplikacji) wpływały na aktywność mikroorganizmów i rozkład pentiopiradu (Rys. 15 i 19). Otrzymane wyniki korelują z danymi otrzymanymi w laboratoryjnych badaniach degradacji przez mieszaninę bakterii i grzybów.

Pentipirad jest nową substancją czynną wprowadzoną na rynek w Polsce w 2015 roku i w literaturze zarówno polskiej jak i światowej brak jest danych dotyczących zanikania pentipiradu, jedynie baza PPDB podaje, że w melonie czas połowicznego zanikania wynosi 3,1 dnia (PPDB). Brak jest również danych dotyczących degradacji pentipiradu przez mikroorganizmy w warunkach polowych.

Przeprowadzone badania polowe wskazują, że istotnym czynnikiem wpływającym na możliwość zastosowania mikroorganizmów w rozkładzie fungicydów są warunki pogodowe, a w szczególności opady. W doświadczeniach, w których po aplikacji preparatu biologicznego wystąpiły opady deszczu, mikroorganizmy zostały zmyte i nie obserwowano ich aktywności. W sprzyjających warunkach pogodowych następowała degradacja substancji czynnych. Ważnym aspektem jest również to, że pomimo faktu, iż wszystkie stosowane fungicydy wykazywały działanie systemiczne, obserwowano degradację badanych substancji czynnych w nich zawartych. Większego rozkładu można byłoby się spodziewać gdyby w badaniach przeprowadzanych w warunkach polowych zastosowano środki o działaniu powierzchniowym (np. kaptan).

Przeprowadzone w niniejszej pracy doświadczenia wskazują, że istnieje potrzeba kontynuacji badań nad wpływem mikroorganizmów na degradację pestycydów, co mogłoby znacznie rozszerzyć asortyment preparatów biologicznych na rynku, a także przyczynić się do poprawy jakości produkowanych owoców.

6. WNIOSKI

1. Największy stopień degradacji substancji czynnej przez bakterie *B. subtilis* w warunkach laboratoryjnych stwierdzono dla fluopyramu (2%-10%), natomiast najniższy dla tebukonazolu (0,2%-0,5%).
2. Największy stopień degradacji substancji czynnej przez grzyb *T. harzianum* w warunkach laboratoryjnych stwierdzono dla pyraklostrobiny (83,7%-99,4%), natomiast najniższy dla tebukonazolu (44,5%-49,2%).
3. Największy stopień degradacji substancji czynnej przez mieszaną kulturę bakterii *B. subtilis* i grzyb *T. harzianum* w warunkach laboratoryjnych stwierdzono dla boskalidu (64,7%-66,8%), natomiast najniższy dla tebukonazolu (2,5%-23,3%). Wyniki te mogą świadczyć o inhibującym oddziaływaniu bakterii na szczepy grzybów.
4. Największy wpływ na degradację badanych substancji czynnych miał grzyb *T. harzianum*, mniejszy mieszaną kulturą bakterii i grzybów, natomiast najmniejszy bakterie *B. subtilis*.
5. Spośród wszystkich badanych substancji czynnych jedynie tebukonazol wykazywał działanie inhibujące zarówno w stosunku do bakterii (stężenie 100 µg/ml) jak i grzybów (500 µg/ml i 1000 µg/ml).
6. Największy stopień degradacji przez bakterie *B. subtilis* i grzyba *T. harzianum* zawarte w preparacie Zumba Plant® zastosowanym w warunkach polowych w uprawie jabłek odmiany Gloster stwierdzono dla boskalidu (52%), natomiast najniższy dla tebukonazolu w odmianie Gala (0,5%).
7. Na degradację fungicydów przez mikroorganizmy zawarte w preparacie Zumba Plant® stosowanym w uprawach polowych duży wpływ mają warunki pogodowe.

7. PODSUMOWANIE

Najważniejszym celem rolnictwa jest produkcja bezpiecznej i wysokiej jakości żywności. Wraz z postępowaniem technologii służących zwiększaniu efektywności produkcji, rosną problemy związane ze stosowaniem w rolnictwie syntetycznych związków chemicznych, w tym między innymi ich toksyczny wpływ na zdrowie człowieka i środowisko oraz rozwój oporności na patogeny roślin i szkodniki. W celu zmniejszenia ryzyka związanego ze stosowaniem pestycydów, opracowano działania promujące wdrażanie integrowanych systemów ochrony roślin. Ich celem jest odpowiednie wykorzystanie stosowanych środków ochrony roślin ukierunkowane na faktyczne występowanie zagrożeń upraw. W 2014 wprowadzono Integrowaną Ochronę Roślin, w której metody biologiczne mają pierwszeństwo stosowania przed metodami chemicznymi. W pracy podjęto ocenę wpływu mikroorganizmów zawartych w preparacie biologicznym na degradację wybranych substancji czynnych chemicznych środków ochrony roślin.

Celem podjętych badań było ustalenie w warunkach laboratoryjnych (*in vitro*) stopnia rozkładu substancji czynnych fungicydów (fluopiramu, tebukonazolu, boskalidu, pyraklostrobiny i pentiopiradu) przez szczepy bakterii *Bacillus subtilis* PCM 486 i grzyba *Trichoderma harzianum* KKP 534, a także przez mieszaną kulturę bakterii i grzybów oraz określenie w warunkach polowych (*in vivo*) czy stosowanie komercyjnego preparatu biologicznego Zumba Plant® zawierającego szczepy bakterii i grzybów wpływa na rozkład substancji czynnych fungicydów w jabłkach.

W badaniach laboratoryjnych, oprócz wyznaczenia stopnia degradacji oceniono stężenia inhibujące/bójcze badanych substancji czynnych dla bakterii *B. subtilis* i drożdży referencyjnych *S. cerevisiae* oraz żywotność komórek *B. subtilis*. Po ekspozycji bakterii, grzybów oraz mieszanej kultury stosowanych organizmów względem testowanych substancji czynnych pestycydów, największy stopień degradacji zanotowano dla pyraklostrobiny (99%) przez grzyb *T. harzianum*, a najniższy dla tebukonazolu przez *B. subtilis* (0,2-0,5%).

Badania polowe dotyczące degradacji substancji czynnych zawartych w preparatach chemicznych Luna Experience 400 SC, Bellis 38 WG i Fontelis 200 SC przez komercyjny preparat Zumba Plant® przeprowadzono w trzyletnim cyklu badań na 5 odmianach jabłoni. Największy stopień degradacji stwierdzono dla boskalidu (52%) w uprawie jabłek odmiany Gloster, natomiast najniższy dla tebukonazolu w odmianie Gala (0,5%). Wyznaczono również kinetyki zanikania badanych substancji czynnych oraz określono czas połowicznego zanikania w jabłkach.

8. SUMMARY

Production of safe foodstuffs of high quality is the most important aim of the agriculture. With technological advancements targeting at increasing production effectiveness, problems associated with the use of synthetic chemicals in the agriculture increase; including their toxic influence on human health and the environment, and development of resistance to plant pathogens and pests. To reduce risks related to the use of pesticides, actions promoting implementation of integrated plant protection systems were developed. They aim at a correct use of plant protection products, focusing on actual hazards to crops. In 2014, the Integrated Pest Management was introduced, in which biological methods have priority over chemical ones. The study evaluates the influence of micro-organisms used in biological preparation on degradation of selected active substances of chemical plant protection products.

The aim of the research was to determine in the laboratory conditions (*in vitro*) a degree of degradation of fungicide active substances (fluopyram, tebuconazole, boscalid, pyraclostrobin and penthiopyrad) by strains of bacteria, *Bacillus subtilis* PCM 486, and fungus, *Trichoderma harzianum* KKP 534, and by a mixed culture of bacteria and fungi, as well as to establish in field conditions (*in vivo*) whether the use of a commercially available preparation Zumba Plant® containing bacteria and fungi strains influences degradation of fungicide active substances in apples.

Beside determining the degree of degradation, the laboratory studies also evaluated levels of the studied active substances that were inhibiting/biocidal to *B. subtilis* and reference yeast, *S. cerevisiae*, as well as viability of *B. subtilis* cells. Following exposure of bacteria, fungi, and the mixed culture of used micro-organisms to tested pesticide active substances, the noted degree of degradation was the highest (99%) for pyraclostrobin degraded by the fungus *T. harzianum*, and the lowest (0.2–0.5%) for tebuconazole degraded by *B. subtilis*.

The field experiments concerning degradation of active substances used in chemical preparations Luna Experience 400 SC, Bellis 38 WG and Fontelis 200 SC by the commercially available formulation Zumba Plant® were conducted in five varieties of apple trees in a three-year research cycle. The degree of degradation was the highest (52%) for boscalid in apples of the Gloster variety, and the lowest (0.5%) for tebuconazole in the Gala variety. Furthermore, dissipation kinetics and half-lives in apples were also established for the studied active substances.

9. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ADI	akceptowalne dzienne pobranie (ang. <i>Accetable Daily Intake</i>);
ARfD	ostra dawka referencyjna (ang. <i>Acute Reference Dose</i>);
BCF	współczynnik biokoncentracji (ang. <i>Bioconcentration Factor</i>);
BO	bulion odżywczy (ang. <i>nutrient broth</i>);
CT₅₀	biologiczny okres półtrwania (ang. <i>half-life clearance time</i>)
Detektor μEC	detektor wychwytu elektronów (ang. <i>Electron Capture Detector</i>);
Detektor MS	detektor mas typu potrójny kwadrupol (ang. <i>Triple Quadrupole Mass Detector</i>);
Detektor NP	detektor azotowo-fosforowy (ang. <i>Nitrogen Phosphorus Detector</i>);
DMI	inhibitory demetylacji (ang. <i>Demethylation Inhibitors</i>);
DT₅₀	czasu połowicznego zanikania (ang. <i>dissipation half-life</i>);
GC	chromatografia gazowa (ang. <i>Gas Chromatography</i>);
GO	granica oznaczalności (LOQ, ang. <i>Limit of Quantification</i>);
K_{ow} (P)	współczynnik podziału oktanol-woda (ang. <i>octanol-water partition coefficient</i>);
LD₅₀	dawka śmiertelna (ang. <i>Lethal Dose</i>);
MBC/MFC	test określający minimalne stężenie bójcze dla mikroorganizmów (ang. <i>Minimum Bactericidal/Fungicidal Concentration</i>);
MIC	test oceny stopnia inhibicji wzrostu wobec mikroorganizmów patogennych (ang. <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>);
MRM	monitorowanie reakcji wielokrotnych (ang. <i>Multiple Reaction Monitoring</i>);
OD₆₀₀	gęstość optyczna (ang. <i>Optical Density</i>) mierzona przy długości fali 600 nm
PDB	bulion glukozowo – ziemniaczany (ang. <i>Potato Dextrose Broth</i>)

PGPR	grupa bakterii stymulujących wzrost roślin (<i>ang. Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i>);
QoI	zewnętrzne inhibitory chinonu (<i>ang. Quinone Outside Inhibitors</i>);
RASFF	Krajowy System Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznej Żywności (<i>ang. Rapid Alert System for Food and Feed</i>);
RFU	względna jednostka fluorescencji (<i>ang. Relative Fluorescence Units</i>);
RSD	względne odchylenie standardowe (<i>ang. Relative Standard Deviation</i>);
SD	odchylenie standardowe (<i>ang. Standard Deviation</i>);
SDHI	inhibitory dehydrogenazy bursztynianowej (<i>ang. Succinate Dehydrogenase Inhibitors</i>);
t_{1/2}	czas połowicznego zanikania (<i>ang. dissipation half-life</i>);
TPP	wzorzec wewnętrzny – fosforan(V) trifenylu (<i>ang. Triphenyl Phosphate</i>).

10. LITERATURA

1. Alaniz S., Leoni C., Bentancur O., Mondino P. 2014. Elimination of summer fungicide sprays for apple scab (*Venturia inaequalis*) management in Uruguay. *Sci Horti*. 165: 331-335. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.016>.
2. Aktar M. W., Sengupta D., Chowdhury A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*. 2 (1): 1-12. Doi: 10.2478/v10102-009-0001-7.
3. Anwar S., Liaquat F., Khan Q. M., Khalid Z. M., Iqbal S. 2009. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. *J Hazard Mater*. 168: 400-405. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.02.059.
4. Aune D., Giovannucci E., Boffetta P., Fadnes L. T., Keum N., Norat T., Greenwood D. C., Riboli E., Vatten L. J., Tonstad S. 2017. Fruit and vegetable intake and the risk of cardiovascular disease, total cancer and all-cause mortality—a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Int J Epidemiol*. 46 (3): 1029-1056. Doi: 10.1093/ije/dyw319.
5. Awad M. A., Jager A., van Westing L. M. 2000. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. *Scientia Horti-Amsterdam*. 83 (3-4): 249-263. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00124-7).
6. Awasthi N., Kumar A., Makkar R., Cameotra S. S. 1999. Biodegradation of soil-applied endosulfan in the presence of a biosurfactant. *J Environ Sci Health B*. 34 (5): 793-803. Doi: <https://doi.org/10.1080/03601239909373226>.
7. Avenot H. F., Michailides T. J. 2010. Progress In understanding molecular mechanisms and evolution of resistanceto succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Prot*. 29: 643-651. Doi: 10.1016/j.cropro.2010.02.019.
8. Aziz M. W., Sabit H., Tawakkol W. 2014. Biodegradation of Malathion by *Pseudomonas* Spp. and *Bacillus* Spp. Isolated Frompolluted Sites in Egypt. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*. 14 (9): 855-862. Doi: 10.5829/idosi.aejaes.2014.14.09.867.
9. Bardas G. A., Veloukas T., Koutita O., Karaoglanidis G. S. 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups. *Pest Manag Sci*. 66: 967-973. Doi: 10.1002/ps.1968.
10. Bhuimbar M.V., Kulkarni Ashwini N., Ghosh Jai S. 2011. Detoxification of chlorpyrifos by *Micrococcus luteus* NCIM 2103, *Bacillus subtilis* NCIM 2010 and *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2036. *Res J Envir Earth Sci*. 3 (5): 614-619.

11. Biziuk M. 2001. Praca zbiorowa. Pestycydy występowanie oznaczanie i unieszkodliwianie. WNT, Warszawa, 276 ss.
12. Bondonno N. P., Catherine P., Bondonno C. P., Ward N. C., Hodgson J. M., Croft K. D. 2017. The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. Trends Food Sci Tech. 69: 243-256. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.012>.
13. Bowen J. K., Mesarich C. H., Bus V. G. M., Beresford R. M., Plummer K. M., Templeton M. D. 2011. *Venturia inaequalis*: the causal agent of apple scab. Mol Plant Pathol. 12 (2): 105-122. Doi: 10.1111/J.1364-3703.2010.00656.X.
14. Boyer J., Liu R. H. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. Nutr J. 3 (5). Doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2891-3-5>.
15. Broniarek–Niemic A. 2016. The resistance of *Venturia inaequalis* to fungicides, with the special emphasis of strobilurin. Odporność *Venturia inaequalis* na fungicydy ze szczególnym uwzględnieniem strobil uryń. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin. 56 (1): 52-61. Doi: 10.14199/999-2016-009.
16. Bryk H. 2010. Choroby przechowalnicze jabłek i gruszek. s. 17–26. W: VI Międzynarodowe Targi Agrotechniki Sadowniczej. Warszawa, 15-16.01.2010, 162 ss
17. Bryk H. 2019. Preparaty biologiczne zawierające grzyby. Informator sadowniczy. 1/2019: 1-4.
18. Chance G. W. 2001. Environmental contaminants and children's health: Cause for concern, time for action. Paediatr Child Health. 6 (10): 731-743.
19. Chang S. K., Alasalvar C., Shahidi F. 2016. Review of dried fruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. J Funct Foods. 21: 113-132. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.034>.
20. Chen L., Zhang S. 2010. Dissipation and residues of boscalid in strawberries and soils. Bull Environ Contam Toxicol. 84 (3): 301-304. Doi: 10.1007/s00128-010-9934-y.
21. Cycoń M., Mrozik A., Piotrowska–Seget Z. 2017. Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide–polluted soil: A review. Chemosphere. 172: 52-71. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.12.129.
22. Cycoń M., Wójcik M., Piotrowska–Seget Z. 2011. Biodegradation kinetics of the benzimidazole fungicide thiophanate-methyl by bacteria isolated from loamy sand soil. Biodegradation. 22 (3): 573-583. Doi: 10.1007/s10532-010-9430-4.
23. Czaja K., Góralczyk K., Struciński P., Hernik A., Korcz W., Minorczyk M., Łyczewska M., Ludwicki J K. 2015. Biopesticides – towards increased consumer safety in the European Union. Pest Manag Sci. 71: 3-6. Doi: 10.1002/ps.3829.

24. Deb P., Talukdar S. A., Mohsina K., Sarker P. K., Sayem S. M. A. 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. SpringerPlus 2: 154. Doi: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-154>.
25. Dong B., Hu J. 2014. Dissipation and residue determination of fluopyram and tebuconazole residues in watermelon and soil by GC-MS. Int J Environ An Ch. 94 (5): 493-505. Doi: 10.1080/03067319.2013.841152.
26. Dyrektywa (WE) 128/2009. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów. Dz. Urz. UE L 309 z 24.11.2009, str. 71.
27. Elad Y. 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. Crop Prot.. 19: 709-714. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00094-6).
28. Etykieta Bellis 38 WG. https://www.gov.pl/documents/912055/913531/Bellis_38_WG_-_ET_31-08-2018.pdf. [dostęp: 13.06.2019].
29. Etykieta Luna Experience 400 SC. https://www.gov.pl/documents/912055/913531/Luna_Experience_400_SC2.pdf/afb8e532-d7d3-e0c6-996a-5b0a3d2f2ca0. [dostęp: 13.06.2019].
30. Etykieta Fontelis 200 SC. https://www.gov.pl/documents/912055/913531/Fontelis_200_SC_-_ET_18-06-2018.pdf. [dostęp: 13.06.2019].
31. Etykieta preparatu Zumba Plant®. http://www.naturalcrop.com/images/produkty_info/zumbaplant/zumbaplant.pdf. [dostęp: 13.06.2019].
32. Folchetti L. D., Monfort-Pires M., de Barros C. R., Martini L. A., Ferreira S. R. 2014. Association of fruits and vegetables consumption and related-vitamins with inflammatory and oxidative stress markers in prediabetic individuals. Diabetol Metab Syndr. 6 (22). Doi: <https://doi.org/10.1186/1758-5996-6-22>.
33. Fenoll J., Ruiz E., Hellín P., Lacasa A., Flores P. 2009. Dissipation rates of insecticides and fungicides in peppers grown in greenhouse and under cold storage conditions. Food Chem. 113 (2): 727-732. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.007>.
34. Ferguson J. A., Korte F. 1977. Epoxidation of aldrin to exo-dieldrin by soil bacteria. Appl Environ Microbiol. 34 (1): 7-13.
35. Fujiwara K., Nakashima S., Sami M., Kanda T. 2013. Ninety-day dietary toxicity study of apple polyphenol extracts in Crl: CD (SD) rats. Food Chem Toxicol. 56: 214-222. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.021>.
36. Gangireddygar S. R. V., Kanderi D., Golla R., Bangeppagari M., Gundi V. A. K. B., Ntushelo K., Reddy Bontha R. 2017. Biodegradation of Quinalphos by a Soil Bacterium – *Bacillus subtilis*. Pak J Biol Sci. 20 (8): 410-422. Doi: 10.3923/pjbs.2017.410.422.

37. Gangola S., Sharma A., Bhatt P., Khati P., Chaudhary P. 2018. Presence of esterase and laccase In *Bacillus subtilis* facilitates biodegradation and detoxification of cypermethrin. *Sci Rep.* 8 (1): 12755. Doi: 10.1038/s41598-018-31082-5.
38. Gulfi M., Arrigoni E., Amadò R. 2006. The chemical characteristics of Apple pectin influence its fermentability *In vitro*. *LWT-Food Sci Technol.* 39 (9): 1001-1004. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.02.013>.
39. Grabowski M. 1999. Choroby drzew owocowych. Plantpress, Kraków, 132 ss.
40. Grammen A., Wenneker M., Van Campenhout J., Pham K. T. K., Van Hemelrijck W., Bylemans D., Geeraerd A., Keulemans W. 2019. Identification and pathogenicity assessment of *Colletotrichum* isolates causing bitter rot of apple fruit in Belgium. *Eur J Plant Pathol.* 153: 253-269. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1539-z>.
41. Grotowska M., Janda K., Jakubczyk K. 2018. Wpływ pestycydów na zdrowie człowieka. Effect of pesticides on human health. *Pomeranian J Life Sci.* 64 (2): 42-50.
42. Harish R., Supreeth M., Chauhan J. B. 2013. Biodegradation of organophosphate pesticide by soil fungi. *Adv Bio Tech.* 12 (09): 4-8.
43. Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol.* 2: 42-56. Doi: 10.1038/nrmicro797.
44. Harwood C.R., Cranenburgh R. 2008. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol.* 16 (2): 73-79. Doi: 10.1016/j.tim.2007.12.001.
45. He F. J., Nowson C. A., Lucas M., MacGregor G. A. 2007. Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: meta – analysis of cohort studies. *J Hum Hypertens.* 21 (9): 717-728. Doi: 10.1038/sj.jhh.1002212.
46. Higa T., Parr J F. 1994. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. International Nature Farming Research Centre, Atami, Japan. 16 ss.
47. Huang Y., Xiao X., Li F., Xiao M., Lin D., Long X., Wu Z. 2018. Microbial Degradation of Pesticide Residues and an Emphasis on the Degradation of Cypermethrin and 3-phenoxy Benzoic Acid: A Review. *Molecules.* 23: 2313. Doi: 10.3390/molecules23092313.
48. Hyson D. A. 2011. A Comprehensive Review of Apples and Apple Components and Their Relationship to Human Health. *Adv. Nutr.* 2: 408-420. Doi: 10.3945/an.111.000513.
49. IARC Handbook of Cancer 2003. International Agency for Research on Cancer (IARC) Working Group. IARC Handbooks of Cancer Prevention: Fruit and Vegetables. Lyon, France: IARC Press 2003.

50. Jankowska M., Kaczynski P., Hrynko I., Łozowicka B. 2016. Dissipation of six fungicides in greenhouse-grown tomatoes with processing and health risk. *Environ Sci Pollut R.* 23 (12): 11885-11900. Doi: 10.1007/s11356-016-6260-x.
51. Jayaraman P., Naveen Kumar T., Maheswaran P., Sagadevan E., Arumugam P. 2012. In vitro Studies on Biodegradation of Chlorpyrifos by *Trichoderma viride* and *T. harzianum*. *J Pure Appl Microbio.* 6 (3): 1465-1474.
52. Jha G., Thakur K., Thakur P. 2009. The *Venturia* apple pathosystem: pathogenicity mechanisms and plant defence responses. *J Biomed Biotechnol.* 2009. 1-10. Doi: <https://doi.org/10.1155/2009/680160>.
53. Jha C. K., Saraf M. 2015. Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. *E3 Journal of Agricultural Research and Development.* 5 (2): 0108-0119. ISSN: 2276-9897. Dostęp online: <http://www.e3journals.org>.
54. Katayama A., Matsumura F. 1993. Degradation of Organochlorine Pesticides, Particularly Endosulfan, by *Trichoderma Harzianum*. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 1059-1065. Doi: <https://doi.org/10.1002/etc.5620120612>.
55. Kaur P., Balomajumder C. 2019. Simultaneous biodegradation of mixture of carbamates by newly isolated *Ascochyta* sp. CBS 237.37. *Ecotox Environ Safe.* 169: 590-599. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.029>.
56. Khajuria Y. P., Kaul S., Wani A. A., Dhar M. K. 2018. Genetics of resistance in apple against *Venturia inaequalis* (Wint.) Cke. *Tree Genetics & Genomes.* 14: 16. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11295-018-1226-4>.
57. Kim W. G., Weon H. Y., Seok S. J., Lee K. H. 2008. *In Vitro* Antagonistic Characteristics of Bacilli Isolates against *Trichoderma* spp. and Three Species of Mushrooms. *Mycobiology.* 36 (4): 266-269. Doi: 10.4489/MYCO.2008.36.4.266.
58. Kim Y. K., Xiao C. L. 2010. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in field populations of *Botrytis cinerea* from apple in Washington State. *Plant Dis.* 94: 604-612. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-5-0604>.
59. Kim Y. K., Xiao C. L. 2011. Stability and Fitness of Pyraclostrobin – and Boscalid – Resistant Phenotypes in Field Isolates of *Botrytis cinerea* from Apple. *Disease Control and Pest Management.* 101 (11): 1385-1391. Doi: doi:10.1094/PHYTO-04-11-0123.
60. Klaassen C. D., Watkins III J., B. 2014. Casarett & Doull Podstawy Toksykologii. MedPharm, Polska, 642 ss.
61. Koch, A., Felsenstein, F., Stämmeler, G. 2015. No Evidence of QoI Resistance in Apple Powdery Mildew (*Podosphaera leucotricha*). *J Phytopathol.* 163: 178-184. Doi: 10.1111/jph.12302.

62. Kosicka D., Wolna-Maruwka A., Trzeciak M. 2014. Aspekty stosowania *Trichoderma* sp. W ochronie roślin i rozkładzie materii organicznej. Kosmos. 63 (4): 635-642.
63. Koutsos A., Tuohy K. M., Lovegrove J. A. 2015. Apples and Cardiovascular Health—Is the Gut Microbiota a Core Consideration. Nutrients. 7 (6): 3959-3998. Doi: 10.3390/nu7063959.
64. Kraciński P. 2016. Konkurencyjność największych światowych eksporterów jabłek. Roczniki naukowe ekonomii rolnictwa i rozwoju obszarów wiejskich. 103 (2): 106-118.
65. Kubicek C. P., Mach R. L., Peterbauer C. K., Lorito M. 2001. Trichoderma: from genes to biocontrol. J Plant Pathology. 83: 11-23. Doi: <https://www.jstor.org/stable/41998018>.
66. Kumari R. A., Jeevan G., Ashok M., Koteswara Rao C. H., Vamsi K. S. K. 2012. Malathion Degradation by *Bacillus* Spp. Isolated From Soil. IOSRPHR. 2: 37-42.
67. Lichtenstein A. H., Appel L. J., Brands M., Carnethon M., Daniels S., Franch H. A., Franklin B., Kris-Etherton P., Harris W. S., Howard B., Karanja N., Lefevre M., Rudel L., Sacks F., Van H. L., Winston M., Wylie-Rosett J. 2006. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: A scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. Circulation. 114: 82-96.
68. Liu R. H., Liu J., Chen B. 2005. Apples prevent mammary tumors in rats. J Agric Food Chem. 53 (6): 2341-2343. Doi: 10.1021/jf058010c.
69. Liu Z., Chen X., Shi Y., Su Z. 2012. Bacterial degradation of chlorpyrifos by *Bacillus cereus*. Adv Mater Res. 356 (360): 676-680. Doi: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.356-360.676>.
70. Lopes F., M., Batista K. A., Batista G. L., Mitidieri S., Bataus L. A., Fernandes K. F. 2010. Biodegradation of epoxyconazole and piraclostrobin fungicides by *Klebsiella* sp. from soil. World J Microbiol Biotechnol. 26(7):1155-61. Doi: 10.1007/s11274-009-0283-0.
71. López-Ruiz F. J., Pérez-García A., Fernández-Ortuño D., Romero D., García E., de Vicente A., Brown J. K., Torés J. A. 2010. Sensitivities to DMI fungicides in populations of *Podosphaera fusca* in south central Spain. Pest Manag Sci. 66 (7): 801-808. Doi: 10.1002/ps.1948.
72. Łozowicka B., Kaczyński P., Rutkowska E., Jankowska M. 2011. Narażenie dzieci na pozostałości pestycydów w jabłkach. Bromat. Chem. Toksykol. 44 (4): 1079-1086.
73. MacHardy W. E. 1996. Apple Scab, Biology, Epidemiology, and Management. Amer Phytopathological Society, 570 ss.
74. Malepszy S. 2014. Biotechnologia roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 736 ss.
75. Malinowska E., Jankowski K., Wyrębek H., Truba M. 2015. Struktura sprzedaży i zużycia środków ochrony roślin w Polsce w latach 2000-2012 Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach. 104: 173-185.

76. Malmierca M. G., Cardoza R. E., Alexander N. J., McCormick S. P., Hermosa R., Monte E., Gutiérrez S. 2012. Involvement of Trichoderma Trichothecenes in the Biocontrol Activity and Induction of Plant Defense – Related Genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (14): 4856-4868. Doi: 10.1128/AEM.00385-12.
77. Martyniuk S. 2012. Czynniki wpływające na wykorzystanie biopestycydów mikrobiologicznych w ochronie roślin. Factors affecting the use of microbial biopesticides In plant protection. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin*. 52 (4): 957-962. Doi: <http://dx.doi.org/10.14199/ppp-2012-165>.
78. Masny S., Jankowski P. 2012. Influence of meteorological factors on release of *Venturia inaequalis* ascospores and occurrence of critical infection periods of apple scab. Wpływ czynników meteorologicznych na wysiewy askospor grzyba *Venturia inaequalis* i występowanie okresów krytycznych parcha jabłoni. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin*. 52 (3): 638-641. Doi: <http://dx.doi.org/10.14199/ppp-2012-111>.
79. Matsumura F., Boush G. M. 1967. Dieldrin degradation by soil microorganisms. *Science*. 156: 959-961. Doi: 10.1126/science.156.3777.959.
80. Matsumura F., Boush G. M. 1968. Degradation of insecticides by a soil fungi *Trichoderma viride*. *J Econom Entomol* 61: 610-612. Doi: <https://doi.org/10.1093/jee/61.3.610>.
81. Messing R., Broudeur J. 2018. Current challenges to the implementation of classical biological control. *BioControl* 63 (1): 1-9. Doi: 10.1007/s10526-017-9862-4.
82. Meszka B. 2012. Choroby grzybowe. s. 116-127. W: „Jabłonie” (Badowska-Czubik T., Bielicki P., Bryk H., Buczek M., Cieślińska M., Kołtowski Z., Kruczyńska D., Lisek J., Meszka B., Morgaś H., Rabcewicz J., Rutkowski K., Sekrecka M., Sobiczewski P.J., Treder W., Wawrzyniak A., Wójcik P., red.). Hortpress, Warszawa, 216 ss.
83. Miszczak A. 2018. Badanie pozostałości środków ochrony roślin w ramach urzędowej kontroli ich stosowania. Raport za rok 2018. http://www.inhort.pl/files/program_wieloletni/PW_2015_2020_IO/spr_2018/Miszczak_2018_Raport_zadanie_2.5.pdf [dostęp 29.05.2019].
84. Mohanasrinivasan V., Suganthi V., Selvarajan E., Subathra Devi C., Ajith E., Muhammed F. N. P., Sreeram G. 2013. Bioremediation of endosulfan contaminated soil. *Res J Chem Environ*. 17 (11): 93-101.
85. Mohapatra S. 2014. Persistence and dissipation kinetics of trifloxystrobin and tebuconazole in onion and soil. *J Environ Sci Health B*. 49 (7): 513-520. Doi: 10.1080/03601234.2014.896674.

86. Mohapatra S. 2015. Residue levels and dissipation behaviours for trifloxystrobin and tebuconazole in mango fruit and soil. *Environ Monit Assess.* 187 (3): 95. Doi: 10.1007/s10661-015-4324-x.
87. Mohapatra S., Deepa M., Jagdish G. K. 2011. Residue dynamics of tebuconazole and quinalphos in immature onion bulb with leaves, mature onion bulb and soil. *Bulletin Environ Cont Toxicol.* 87 (6): 703-707. Doi: 10.1007/s00128-011-0403-z.
88. Muchembled J., Deweer C., Sahmer K., Halama P. 2018. Antifungal activity of essential oils on two *Venturia inaequalis* strains with different sensitivities to tebuconazole. *Environ Sci Pollut Res Int.* 25 (30): 29921-29928. Doi: 10.1007/s11356-017-0507-z.
89. Navazio L., Baldan B., Moscatiello R., Zuppini A., Woo S. L., Mariani P., Lorito M. 2007. Calcium – mediated perception and defense responses activated in plant cells by metabolite mixtures secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *BMC Plant Biol.* 7: 41. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-41>.
90. Nelson M. L., Yaron B., Nye P. H. 1982. Biologically - induced hydrolysis of parathion in soil: kinetics and modelling. *Soil Biol Biochem.* 14: 223-228. Doi: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(82\)90029-3](https://doi.org/10.1016/0038-0717(82)90029-3).
91. Neri F., Mari M., Brigati S., Bertolini P. 2009. Control of *Neofabraea alba* by plant volatile compounds and hot water. *Postharvest Biology and Technology.* 51 (3): 425-430. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.08.006.
92. Nielsen K. F., Gräfenhan T., Zafari D., Thrane U. 2005. Trichothecene Production by *Trichoderma brevicompactum*. *J Agric Food Chem.* 53 (21): 8190-8196. Doi: 10.1021/jf051279b.
93. Nowacka A., Gnusowski B., Walorczyk S., Drożdżyński D., Raczkowski M., Hołodyńska-Kulas A., Frąckowiak D., Ziółkowski A., Przewoźniak M., Rzesutko U, Domańska I., Pszczolińska K., Łozowicka B., Kaczyński P., Rutkowska E., Jankowska M., Hrynko I., Szpyrka E., Rupar J., Matyaszek A., Kurdziel A., Podbielska M., Słowik-Borowiec M., Szponik M. 2015. Pesticide residues in agricultural crops (2013). Pozostałości środków ochrony roślin w płodach rolnych (rok 2013). *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin.* 55 (4): 423-439. Doi: 10.14199/ppp-2015-071.
94. Nunes C. A. 2012. Biological control of postharvest diseases of fruit. *Eur J Plant Pathol.* 133 (1): 181-196. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9919-7>.
95. Obanda D. N., Shupe T. F., Catallo W. J. 2008. Resistance of *Trichoderma harzianum* to the biocide tebuconazol – Proposed biodegradation pathways. *Holzforschung.* 62 (5): 613-619. Doi: <https://doi.org/10.1515/HF.2008.098>.

96. Osman A. G. 2006. Degradation of the fungicide azoxystrobin by soil microorganisms. U of K J. Agric. Sci. 14 (1): 124-134.
97. Panda J., Tiyaşa K., Das S. 2018. Optimized biodegradation of carcinogenic fungicide Carbendazim by *Bacillus licheniformis* JTC-3 from agro-effluent. Biotechnology Research and Innovation. 2 (1): 45-57. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.10.004>.
98. Patel B. V., Chawla S., Gor H., Upadhyay P., Parmar K. Patel A. R., Shah P. G. 2016. Residue decline and risk assessment of fluopyram + tebuconazole (400SC) in/on onion (*Allium cepa*). Environ Sci Pollut Res. 23 (20): 20871-20881. Doi: 10.1007/s11356-016-7331-8.
99. Patil K. C., Matsumura F., Boush G. M. 1970. Degradation of endrin, aldrin and DDT by soil microorganisms. J App Microbiol. 19: 879-881.
100. Patyal S. K., Sharma I. D., Chandel R. S., Dubey J. K. 2013. Dissipation kinetics of trifloxystrobin and tebuconazole on apple (*Malus domestica*) and soil-a multi location study from north western Himalayan region. Chemosphere. 92 (8): 949-954. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.02.069.
101. Petit C., Chevrier C., Durand G., Monfort C., Rouget F., Garlantezec R., Cordier S. 2010. Impact on fetal growth of prenatal exposure to pesticides due to agricultural activities: a prospective cohort study in Brittany, France. Environmental Health. 9: 71. Doi: <http://www.ehjournal.net/content/9/1/71>.
102. Piechowicz B., Sadło S., Szpyrka E., Stawarczyk K., Stawarczyk M., Grodzicki P. 2016. Disappearance of some fungicides in mature apples immediately before supplying fruit to the consumer. Fresen Environ Bull. 25 (10/2016): 4246-4252.
103. PN-EN 15662:2008. Żywność pochodzenia roślinnego -- Oznaczanie pozostałości pestycydów metodą GC-MS i/lub LC-MS(/MS) po uprzedniej ekstrakcji i rozdzieleniu acetonitrylem oraz oczyszczaniu metodą dyspersyjnej SPE -- Metoda QuEChERS. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa, 81 ss.
104. PN-EN 15662:2018-06. Multimetoda do oznaczania pozostałości pestycydów z zastosowaniem analizy opartej na GC i LC po ekstrakcji/podziale acetonitrylem i oczyszczaniu metodą dyspersyjnej SPE-- Metoda QuEChERS. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa, 82 ss.
105. Podbielska M., Szpyrka E., Piechowicz B., Sadło S., Sudoł M. 2018. Assessment of boscalid and pyraclostrobin disappearance and behavior following application of effective microorganisms on apples. J Environ Sci Heal B. 53 (10): 652-660. Doi: 10.1080/03601234.2018.1474554.
106. Podbielska M., Szpyrka E., Piechowicz B., Zwolak A., Sadło S. 2017. Behavior of fluopyram and tebuconazole and some selected pesticides in ripe apples and consumer exposure

- assessment in the applied crop protection Framework. *Environ Monit Assess.* 189: 350. Doi: 10.1007/s10661-017-6057-5.
107. Poniatowska A., Michalecka M., Bielenin A. 2013. Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. *Eur J Plant Pathol.* 135: 855-865. Doi: 10.1007/s10658-012-0130-2.
108. PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> [dostęp: 29.05.2019].
109. PPDB. Pesticide Properties Database, University of Hertfordshire, Anglia. <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/> [dostęp 29.05.2019].
110. Rampersad S. N. 2012. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors (Basel).* 12 (9). 12347-12360. Doi: 10.3390/s120912347
111. Ravensberg W. J. 2011. Roadmaps to the Succesfull Development and Commercialization of Microbial Pest Control Products for Control of Arthropods. Springer, Dordrecht, Heidelberg, 383 ss.
112. Rees A., Dodd G. F., Spencer J. P. E. 2018. The Effects of Flavonoids on Cardiovascular Health: A Review of Human Intervention Trials and Implications for Cerebrovascular Function. *Nutrients.* 10 (12). Doi: 10.3390/nu10121852.
113. Rocznik Statystyczny Rolnictwa. 2017. Zakład Wydawnictw Statystycznych, Warszawa, 495 ss.
114. Rozporządzenie 2007. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 17 października 2007 r. w sprawie pobierania próbek żywności w celu oznaczania poziomów pozostałości pestycydów. *Dz.U.* 2007 nr 207 poz. 1502.
115. Rozporządzenie WE 178/2002. Rozporządzenie (WE) 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności. *Dz. U. WE L 31 z 01.02.2002*, str.1, z późn. zm.; *Dz. U. UE Polskie wydanie specjalne*, rozdz. 15, t. 006, str. 463-486.
116. Rozporządzenie WE 396/2005. Rozporządzenie (WE) 396/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 lutego 2005r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości pestycydów w żywności i paszy pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz na ich powierzchni, zmieniające dyrektywę Rady 91/414/EWG” *Dz.U. L 70 z 16.03.2005*, str. 1z późn. zm.
117. Rozporządzenie WE 1107/2009. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. dotyczące wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin i uchylającego przepisy dyrektywy Rady 79/117/EWG i 91/414/EWG. *Dz. Urz. UE L 309 z 24.11.2009*, str. 1.

118. Różański L. 1992. Przemiany pestycydów w organizmach żywych i środowisku. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 274 ss.
119. Sadło S., Walorczyk S., Grodzicki P., Piechowicz B. 2016a. Disappearance of captan, boscalid, pyraclostrobin and trifloxystrobin residues in ripe apples during cold storage under controlled atmosphere. *Fresenius Environmental Bulletin*. 25 (6): 1959-1965.
120. Sadło S., Walorczyk S., Grodzicki P., Piechowicz B. 2016b. Usage of the relationship between the application rates of the active ingredient of fungicides and their residue levels in mature apples to creating a coherent system of MRLs. *J Plant Dis Prot* (2016) 123: 101. Doi: <https://doi.org/10.1007/s41348-016-0015-2>.
121. Sadło S., Szpyrka W., Stawarczyk M., Piechowicz B. 2014. Behavior of pyrimethanil, pyraclostrobin, boscalid, cypermethrin and chlorpyrifos residues on raspberry fruit and leaves of Laszka variety. *J Environ Sci Health B*. 49 (3): 159-168. Doi: <https://doi.org/10.1080/03601234.2014.858005>.
122. Safabakhsh M., Koohdani F., Bagheri F., Siassi F., Khajehnasiri F., Sotoudeh G. 2018. Fruit and vegetable intake and pre-diabetes: a case-control study. *Eur J Nutr*. 57 (8): 2953-2962. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1569-x>.
123. Saha S., Jadhav M. R., Shabeer T. P. A., Banerjee K., Sharma B. K., Loganathan M., Rai A. B. 2016. Safety assessment and Bioefficacy of Fluopyram 20%+ Tebuconazole 20% — 40 SC in Chilli, *Capsicum Annum L.* against anthracnose disease. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 86 (2): 359-366. Doi: [10.1007/s40011-014-0450-4](https://doi.org/10.1007/s40011-014-0450-4).
124. Sahoo S. K., Jyot G., Batto R. S., Singh B. 2012. Dissipation kinetics of trifloxystrobin and tebuconazole on chilli and soil. *Bull Environ Contam Toxicol*. 88 (3): 368-371. Doi: [10.1007/s00128-011-0464-z](https://doi.org/10.1007/s00128-011-0464-z).
125. Salunkhe V. P., Sawant I. S., Banerjee K., Wadkar P. N., Sawant S. D., Hingmire S. A. 2014. Kinetics of degradation of carbendazim by *B. subtilis* strains: possibility of in situ detoxification. *Environ Monitor Assess*. 186: 8599-8610. Doi: [10.1007/s10661-014-4027-8](https://doi.org/10.1007/s10661-014-4027-8).
126. Sansone G., Lambrese Y., Calvente V., Fernández G., Benuzzi D., Sanz Ferramola M. 2018. Evaluation of *Rhodosporidium fluviale* as biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on apple fruit. *Lett Appl Microbiol*. 66 (5): 455-461. Doi: [10.1111/lam.12872](https://doi.org/10.1111/lam.12872).
127. SANTE 2015. Document SANTE/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, 46 ss.
128. SANTE 2017. Document SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, 46 ss.

129. Sariwati A., Purnomo A. S., Kamei I. 2017. Abilities of Co-cultures of Brown-Rot Fungus *Fomitopsis pinicola* and *Bacillus subtilis* on Biodegradation of DDT. *Curr Microbiol.* 74 (9): 1068-1075. Doi: 10.1007/s00284-017-1286-y.
130. Sasikala C., Jiwal S., Rout P., Ramya M. 2012. Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated from agriculture soil. *World J Microbiol Biotechnol.* 28 (3): 1301-1308. Doi: 10.1007/s11274-011-0879-z.
131. Satapute P., Kaliwal B. 2016. Biodegradation of propiconazole by newly isolated *Burkholderia* sp. strain BBK_9. *3 Biotech.* 6 (1): 110. Doi: 10.1007/s13205-016-0429-3.
132. Schallmeyer M., Singh A., Ward O. P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canad. J. Microbiol.* 50: 1-17. Doi: <https://doi.org/10.1139/w03-076>.
133. Senthilkumar S., Anthonisamy A., Arunkumar S., Sivakumari V. 2011. Biodegradation of Methyl Parathion and Endosulfan Using *Pseudomonas Aeruginosa* and *Trichoderma Viridae*. *J. Environ. Sci. Eng.* 53: 115-122.
134. Sestras A. F., Pamfil D., Dan C., Bolboaca S. D., Jäntschi L., Sestras R. E. 2011. Possibilities to improve apple scab (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.) and powdery mildew [*Podosphaera leucotricha* (Ell. et Everh.) Salm.] resistance on apple by increasing genetic diversity using potentials of wild species. *AJCS.* 5: 748-755.
135. Sharma P., Sharma M., Manokaran R., Singh D. V., Srivastava M. 2016. Use of *Trichoderma* spp. in biodegradation of Carbendazim. *Indian J Agr Sci.* 86 (7): 891-894.
136. Sharmila M., Ramanand K., Sethunathan N. 1989. Effect of yeast extract on the degradation of organophosphorus insecticides by soil enrichment and bacterial cultures. *Can J Microbiol.* 35: 1105-1110. Doi: <https://doi.org/10.1139/m89-185>.
137. Sherif A. M., Elhussein A. A., Osman A. G. 2011. Biodegradation of fungicide Thiram (TMTD) in soil under laboratory conditions. *Am. J. Biotechnol. Mol. Sci.* 1 (2): 57-68. Doi: 10.5251/ajbms.2011.1.2.57.68.
138. Siddaramappa R., Rajaram K. P., Sethunathan N. 1973. Degradation of parathion by bacteria isolated from flooded soil. *Appl Microbiol.* 26 (6): 846-849.
139. Sieńczuk W. 2012. Toksykologia współczesna. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 996 ss.
140. Singh J. S., Pandey V. C., Singh D. P. 2011. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agr Ecosyst Environ.* 140: 339-353. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.01.017>.
141. Singh G., Singh B. 2014. Residue dynamics and risk assessment of trifloxystrobin and tebuconazole on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Am J Environ Prot.* 2 (3): 59-63. Doi: 10.12691/env-2-3-2.

142. Singh B., Kaur R., Singh K. 2009. Degradation of Organophosphate Pesticide, Malathion, by *Bacillus* Spp. Isolated From Soil. Proceedings of the 11th International Conference on Environmental Science and Technology, Chania, Crete, Greece, 3–5 Sept 2009.
143. Slavin J. L., Lloyd B. 2012. Health benefits of fruits and vegetables. *Adv Nutr.* 3 (4): 506-516. Doi: 10.3945/an.112.002154.
144. Sobiczewski P. 2013. Metodyka Integrowanej Ochrony Jabłoni dla Producentów Opracowanie zbiorowe. <http://www.inhort.pl/files/FAPA/sadownictwo/Producent/JABLON-PRODUCENT%20II%20K%20A.pdf>. [dostęp: 31.05.2019].
145. Sommella E., Badolati N., Riccio G., Salviati E., Bottone S., Dentice M., Campiglia P., Tenore G. C., Stornaiuolo M., Novellino E. 2019. A Boost in Mitochondrial Activity Underpins the Cholesterol – Lowering Effect of Annurca Apple Polyphenols on Hepatic Cells. *Nutrients.* 11 (1). Doi: 10.3390/nu11010163.
146. Sosnowska D. 2018. Konserwacyjna metoda biologiczna wsparciem integrowanej ochrony roślin i rolnictwa ekologicznego. The contribution of conservation biological control method to integrated plant protection and organic farming. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin.* 58 (4): 288-293. Doi: 10.14199/ppp-2018-040.
147. Struciński P., Góralczyk K., Czaja K., Hernik A., Korcz W., Ludwicki J. K. 2006. Ocena ryzyka związana z narażeniem na pozostałości pestycydów w żywności pochodzenia roślinnego na etapie rejestracji środka ochrony roślin. *Roczn. PZH.* 57 (4): 303-315.
148. Struciński P., Góralczyk K., Czaja K., Hernik A., Korcz W., Ludwicki J. K. 2007. Ocena ryzyka dla konsumenta przy przekroczeniach najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości pestycydów (NDP) w żywności. Consumer risk assessment in case of maximum residue (MRLs) violation in food. *Roczn. PZH.* 58 (2): 377-388.
149. Sun C., Cang T., Wang Z., Wang X., Yu R., Wang Q., Zhao X. 2015. Degradation of three fungicides following application on strawberry and a risk assessment of their toxicity under greenhouse conditions. *Environ Monit Assess.* 187 (5): 303. Doi: 10.1007/s10661-015-4539-x.
150. Szczęśna-Antczak M., Trzmiel T., 2008. Bakterie rodzaju *Bacillus*. 91-119 ss. W: *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności*; Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z., PWN, Warszawa.
151. Szymczak J., Bryk H., Miszczak A. 2016. Effect of pre-harvest fungicide treatments on protection against bull's eye rot caused by *Neofabarea* spp. and residues in apples. Wpływ przedzbiorczego stosowania fungicydów na ochronę jabłek przed gorzką zgnilizną (*Neofabarea* spp.) oraz pozostałości w owocach. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin.* 56 (2): 162-168. Doi: 10.14199/ppp-2016-027.

152. Tamer M. A. M. T., El-Naggar M. A. H. 2013. Diazinon decomposition by soil bacteria and identification of degradation products by GC-MS. *Soil Environ.* 32 (2): 96-102.
153. Tenore G. C., Caruso D., Buonomo G., D'Avino M., Ciampaglia R., Maisto M., Schisano C., Bocchino B., Novellino E. 2019. Lactofermented Annurca Apple Puree as a Functional Food Indicated for the Control of Plasma Lipid and Oxidative Amine Levels: Results from a Randomised Clinical Trial. *Nutrients.* 11 (1). Doi: 10.3390/nu11010122.
154. Ustawa 2006. Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (t.j. Dz.U. 2019 poz. 1252).
155. Ustawa 2013. Ustawa z dnia 8 marca 2013 r. o środkach ochrony roślin (t.j. Dz. U. z 2018 r. poz. 1310, 1616, 1629, z 2019 r. poz. 235).
156. Veloukas T., Karaoglanidis G. S. 2012. Biological activity of the succinate dehydrogenase inhibitor fluopyram against *Botrytis cinerea* and fungal baseline sensitivity. *Pest Manag Sci.* 68: 858-864. Doi: 10.1002/ps.3241.
157. Veloukas T., Kalogeropoulou P., Markoglou A. N., Karaoglanidis G. S. 2014. Fitness and Competitive Ability of *Botrytis cinerea* Field Isolate with Dual Resistance to SDHI and QoI Fungicides, Associated with Several *sdhB* and the *cytb* G143A Mutations. *Disease Control and Pest Management.* 104 (4): 347-356. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-07-13-0208-R>.
158. Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L., Marra R., Woo S. L., Lorito M. 2008. Trichoderma–plant–pathogen interactions. *Soil Biol Biochem.* 40: 1-10.
159. Vinale F., Ghisalberti E. L., Sivasithamparam K., Marra R., Ritieni A., Ferracane R., Woo S., Lorito M. 2009. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 48: 705-711.
160. Wang Z., Cang T., Qi P., Zhao X., Xu H., Wang X., Zhang H., Wang X. 2015a. Dissipation of four fungicides on greenhouse strawberries and an assessment of their risks. *Food Control.* 55: 215-220. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.050>.
161. Wang X., Hou X., Liang S., Lu Z., Hou Z., Zhao X., Sun F., Zhang H. 2018. Biodegradation of fungicide Tebuconazole by *Serratia marcescens* strain B1 and its application in bioremediation of contaminated soil. 127: 185-191. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.12.001>
162. Wang Y., Wang C., Gao J., Liu C., Cui L., Li A. 2015b. Dissipation, residues, and safety evaluation of trifloxystrobin and tebuconazole on ginseng and soil. *Environ Monit Assess.* 187 (6): 344. Doi: 10.1007/s10661-015-4591-6.

163. WHO 2009. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification: 2009. 81 ss. https://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf [dostęp: 18.05.2019].
164. Wołejko E., Łozowicka B., Kaczyński P., Jankowska M., Piekut J. 2016. The influence of effective microorganisms (EM) and yeast on the degradation of strobilurins and carboxamides in leafy vegetables monitored by LC – MS/MS and health risk assessment. *Environ Monit Assess.* 188 (1): 64. Doi: 10.1007/s10661-015-5022-4.
165. Wyszukiwarka środków ochrony roślin www.agrofy.pl/wyszukiwarka.
166. Yang M., Zhang J., Zhang J., Rashid M., Zhong G., Liu J. 2018. The control effect of fungicide pyraclostrobin against freckle disease of banana and its residue dynamics under field conditions. *J Environ Sci Health B.* 53 (9): 615-621. Doi: 10.1080/03601234.2018.1473974.
167. Yao B., Fang H., Xu W., Yan Y., Xu H., Liu Y., Mo M., Zhang H., Zhao Y. 2014. Dietary fiber intake and risk of type 2 diabetes: a dose–response analysis of prospective studies. *Eur J Epidemiol.* 29 (2): 79-88. Doi: 10.1007/s10654-013-9876-x.
168. You X., Liu C., Liu F., Liu Y., Dong J. 2012. Dissipation of pyraclostrobin and its metabolite BF-500-3 in maize under field conditions. *Ecotoxicol Environ Saf.* 80: 252-257. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.03.012.
169. Youness M., Sancelme M., Combourieu B., Besse-Hoggan P. 2018. Identification of new metabolic pathways in the enantioselective fungicide tebuconazole biodegradation by *Bacillus* sp. 3B6. *J Hazard Mater.* 351: 160-168. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.02.048>.
170. Zacharia J.T. 2011. Identity, Physical and Chemical properties of Pesticides w Pesticides in the Modern World – Trends in Pesticides Analysis. IntechOpen. Wielka Brytania. Doi: 10.5772/701.
171. Zamojska J., Malinowski H. 2012. Integrated plant protection and pest resistance to pesticides in Poland. Integrowana metoda ochrony roślin a odporność agrofagów na pestycydy w Polsce. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin.* 52 (4): 1222-1226
172. Zhang Z. H., Li H. Y., Wu M., Yuan Y. W., Hu X. Q., Zheng W.R. 2009a. Residue and risk assessment of chlorothalonil, myclobutanil and pyraclostrobin in greenhouse strawberry. *Chinese Journal of Pesticide Science.* 11 (4): 449-455.
173. Zhang L., Qiao X., Ma L. 2009b. Influence of environmental factors on degradation of carbendazim by *Bacillus pumilus* strain NY97-1. *Int J Environ Pollut* 38: 309-317. Doi: 10.1504/IJEP.2009.027231.

174. Zhang F., Wang L., Zhou L., Wu D., Pan H., Pan C. 2012. Residue dynamics of pyraclostrobin in peanut and field soil by QuEChERS and LC-MS/MS. *Ecotox. Environ. Safe.* 78: 116-122. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.11.003.
175. Zhang H., Zhang Y., Hou Z., Wu X., Gao H., Sun F., Pan H. 2014. Biodegradation of triazine herbicide metribuzin by the strain *Bacillus* sp. N1. *J Environ Sci Health B.* 49 (2): 79-86. Doi: 10.1080/03601234.2014.844610.
176. Zhu J., Zhao Y., Qiu J. 2010. Isolation and application of a chlorpyrifos-degrading *Bacillus licheniformis* ZHU-1. *Afr J Microbiol Res.* 4: 2410-2413.
177. Zhao H., Kimb Y. K., Huang L., Xiaob C. L. 2010. Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Botrytis cinerea* populations from apple and pear in Washington State. *Postharvest Biol Tec.* 56: 12-18. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2009.11.013.
178. Źródła internetowe:
- www.agrecol.pl;
- www.doradztwosadownicze.pl;
- www.ogrodinfo.pl;
- www.poradnikogrodniczy.pl;
- www.sadnowoczesny.pl;
- www.weatheronline.pl.